



# UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA

## FACULTAD DE CIENCIAS



### ACTA DE SUSTENTACIÓN 055-2017-FC-UNP

#### FACULTAD DE CIENCIAS

Los Miembros del Jurado Calificador que suscriben, reunidos para evaluar la Tesis denominada **"COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS IgG CONTRA PvAMA-1, PvMSP-1<sub>19</sub> Y PvAMA-1/PvMSP-1<sub>19</sub> DETECTADOS POR ELISA INDIRECTO EN ESTUDIOS SEROLÓGICOS DE MALARIA EN LA AMAZONÍA PERUANA"** presentada por el señor Bachiller **ANTHONY MOISES TORRES RUESTA**, con el asesoramiento del **McBlgo. Jaime Napoleón Fernández Ponce** y el Co-Asesor **Ángel M. Rosas Aguirre, MD, MPH, PhD.**; oídas las observaciones y respuestas a las preguntas formuladas, y de conformidad al Reglamento de Tesis para obtener el Título Profesional en la Facultad de Ciencias, lo declaran:

**APROBADO (x)**

**DESAPROBADO ( )**

Con la mención de:

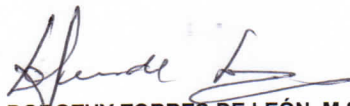
EXCELENTE

(x) En consecuencia, queda en condición de ser ratificado por el Consejo de Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Piura, y recibir el **TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO**.

( ) En consecuencia, queda en condición de ser ratificado por el Consejo Universitario de la Universidad Nacional de Piura, y recibir el **TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO**; después que el sustentante incorpore la sugerencia del Jurado Calificador.

Piura, 14 de agosto del 2017.

UNP

  
McBlgo. MARÍA DOROTHY TORRES DE LEÓN, M.Sc.  
PRESIDENTE DE JURADO DE TESIS

  
McBlgo. CÉSAR AUGUSTO TORRES DÍAZ, M.Sc.  
SECRETARIO DE JURADO DE TESIS

  
McBlgo. JORGE LUIS BERMEJO BENITES  
VOCAL DE JURADO DE TESIS



Campus Universitario - Urb. Miraflores S/N. Castilla  
PIURA - PERU

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**“Comparación de los niveles de anticuerpos IgG contra PvAMA-1,  
PvMSP-1<sub>19</sub> y PvAMA-1/PvMSP-1<sub>19</sub> detectados por ELISA indirecto en  
estudios serológicos de malaria en la Amazonía peruana”**

**PRESENTADA POR:**

**Br. ANTHONY MOISES TORRES RUESTA**

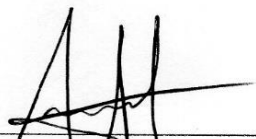
**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**BIÓLOGO**

**PIURA – PERU**

**AGOSTO – 2017**

“Comparación de los niveles de anticuerpos IgG contra PvAMA-1, PvMSP-1<sub>19</sub> y  
PvAMA-1/PvMSP-1<sub>19</sub> detectados por ELISA indirecto en estudios serológicos  
de malaria en la Amazonía peruana”



B.Sc. Anthony Moises Torres Ruesta.  
EJECUTOR DE TESIS.



Mtblgo. Jaime Fernández Ponce  
ASESOR.



Ángel M. Rosas Aguirre, MD, MPH, PhD.  
CO-ASESOR.



Mtblga. María Dorothy Torres de León. M.Sc.  
PRESIDENTE DEL JURADO.



Mtblgo. Cesar Torres Díaz. M.Sc.  
SECRETARIO DEL JURADO.



Mtblgo. Jorge Bermejo Benites.  
VOCAL DEL JURADO.

## **DEDICATORIA**

A la memoria de dos grandes amigos y mentores: mi maestro, Wilder Rodríguez Arteaga y mi abuelo, Moisés Torres Bambarén.

*“Que leurs âmes reposent en paix”.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Estos últimos doce meses han significado para mí una etapa de madurez y consolidación en mi vocación como joven científico. He tenido la oportunidad de explorar diversos campos de investigación en las ciencias biológicas y de compartir una mesa de laboratorio con hombres y mujeres de ciencia de las más diversas culturas y lenguas, experiencias que en conjunto me han servido para la cristalización de este proyecto de tesis, el cual no hubiese sido posible sin el soporte de muchas personas importantes, es por ello que dedico estas líneas para agradecer:

A mi familia, por su amor incondicional y apoyo en el inicio de cada una de mis aventuras, por saber comprender mi ausencia en muchas ocasiones especiales y por haber siempre alimentado mis deseos superación personal y profesional.

A la plana docente de la Escuela Profesional de Ciencias Biológicas, por su dedicación en la cátedra a pesar de las limitaciones e impacto en mi formación de pregrado, la cual ha sido importante en la consecución de mis logros académicos. Agradezco especialmente a Dorothy Torres de León, Cesar Torres Díaz y Jorge Bermejo Benites, quienes han sido mi referencia en el estudio de microorganismos, y que además hoy cumplen el rol de juzgar mi defensa de tesis.

A mi maestro, asesor y amigo, Jaime Fernández Ponce, por haberse embarcado conmigo en este proyecto, por compartir sus conocimientos y por su ojo crítico, necesario en la producción de buena ciencia. Además por su continua disposición en apoyarme en la persecución de mis metas académicas.

A Ángel Rosas-Aguirre, Juan José Contreras y Dionicia Gamboa, por confiar en mí y brindarme la gran oportunidad de formar parte del equipo del Laboratorio de Malaria de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por su buen consejo durante el planteamiento y desarrollo experimental de mi tesis, y por su mentoría en los que fueron mis primeros pasos en el estudio epidemiológico-molecular de enfermedades infecciosas.

A mis amigos, compañeros y futuros colegas de la Promoción 2011 de la Escuela Profesional de Ciencias Biológicas, particularmente a: Rayza Suárez, Tania Villegas, Diana Seminario, Tatiana Palacios, Judith Matorel, Karen León, Dania Nonajulca y Ángela Vidal, por haberme acogido y soportado durante cinco años de estudios, por compartir carpetas e interminables amanecidas, por las muchas vivencias llenas de alegrías y algunas otras de tristezas, y por su enorme deseo del bien común y superación grupal.

Finalmente, pero no por ello menos importante, al Ser Supremo, el cual no asocio con ninguna doctrina pero me es innegable su existencia. Por su presencia tangible en cada paso que doy, por su orientación y guía al caminar, por las oportunidades con las que me ha permitido toparme, por su conocimiento, por su guarda y por su amor.

## RESUMEN

Para optimizar la sensibilidad en la detección de anticuerpos adquiridos contra *Plasmodium vivax* en zonas de baja transmisión de malaria se recomienda utilizar múltiples antígenos en las pruebas serológicas. Esto hace que los métodos actuales de serodiagnóstico sean laboriosos y costosos, ya que las muestras colectadas deben ser procesadas individualmente contra cada antígeno considerado en el estudio. El presente trabajo evaluó el desempeño de la quimera PvAMA-1/MSP-1<sub>19</sub> en la detección de anticuerpos como reemplazo al uso de sus antígenos constituyentes: AMA-1 y MSP-1<sub>19</sub>. Para este fin, se evaluaron los niveles de anticuerpos IgG antimalaria de 823 muestras de sangre de habitantes del distrito de Mazán, Departamento de Loreto, utilizando el ensayo ELISA indirecto. La estimación de positividad para cualquiera de ambos antígenos independientes (PvMSP-1<sub>19</sub> y/o PvAMA-1) alcanzó el 39.6% (n=326) siendo estadísticamente similar a aquellas proporciones obtenidas con la quimera usando puntos de cortes a 2 y 2.5 desviaciones estándar sobre la media de la subpoblación seronegativa calculada usando modelos mixtos. Además, se encontraron niveles de concordancia casi perfectos entre los estados serológicos definidos en base a las respuestas contra la quimera y contra cualquiera de ambos antígenos independientes (PvMSP-1<sub>19</sub> y/o PvAMA-1). Los resultados sugieren que los niveles de anticuerpos detectados con la nueva proteína quimérica PvAMA-1/MSP-1<sub>19</sub> proporcionan similar información sobre la exposición a malaria que aquellas contra ambos antígenos independientes, con la ventaja de tener que realizar sólo un ensayo ELISA en lugar de dos utilizando PvMSP-1<sub>19</sub> y PvAMA-1.

**Palabras claves:** *Plasmodium vivax*, malaria, proteína quimérica, serología, ELISA, MSP-1, AMA-1.

## ABSTRACT

To optimize the sensitivity for naturally acquired antibody detection against *Plasmodium vivax* in malaria unstable and low-transmission areas it is highly recommended to use multiple antigens in serologic tests. This makes serodiagnostic protocols become labor-intensive and time-consuming since blood samples must be tested against each antigen considered as part of the study. This research evaluated the performance of the chimera PvAMA-1/MSP-1<sub>19</sub> in the detection of antibodies as potential replacement for the use of its constituent antigens: AMA-1 and MSP-1<sub>19</sub>. To this end, the IgG antibody levels of 823 blood samples from inhabitants of Mazan District, Loreto Department, were evaluated using the indirect ELISA assay. The positive responder proportion for any of both single antigens (either PvMSP-1<sub>19</sub> or PvAMA-1) reached 39.6% (n=326) being statistically similar than the estimates obtained with the chimeric protein using cut-off points at 2 and 2.5 standard deviations above the mean of the seronegative distribution calculated using mixture models. Furthermore, high levels of agreement were found between the serological status based on the responses against the chimera and those for any of both single antigens (PvMSP-1<sub>19</sub> and/or PvAMA-1). The results suggest that antibody levels detected by the novel chimeric protein PvAMA-1/MSP-1<sub>19</sub> provide similar information about malaria exposure than those against both single antigens with the advantage of processing only one ELISA assay per sample instead of two using PvMSP-1<sub>19</sub> and PvAMA-1.

**Key word:** *Plasmodium vivax*, malaria, chimeric protein, serology, ELISA, MSP-1, AMA-1.



## CONTENIDO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>INTRODUCCIÓN .....</b>  | <b>12</b> |
| 1.1 GENERALIDADES DE MALARIA (PALUDISMO) .....   | 15        |
| 1.1.1 Etiología .....  | 15        |
| 1.1.2 Patogénesis y ciclo de vida de <i>Plasmodium spp.</i> .....  | 15        |
| 1.1.3 Cuadro clínico .....   | 17        |
| 1.1.4 Población en riesgo e incidencia .....   | 18        |
| 1.1.5 Diagnóstico .....  | 18        |
| 1.1.6 Tratamiento .....  | 21        |
| 1.2 CONTEXTO ACTUAL DE MALARIA EN EL PERÚ .....  | 22        |
| 1.3 IMPORTANCIA DE LOS ESTUDIOS DE EXPOSICIÓN E INTENSIDAD<br>DE TRANSMISIÓN DE MALARIA (ITM) EN EL PERÚ .....                         | 25        |
| 1.4 MARCADORES SEROLÓGICOS COMO INDICADORES DE EXPOSICIÓN<br>E ITM EN ZONAS DE BAJA TRANSMISIÓN .....                                  | 30        |
| 1.5 PROTEÍNAS RECOMBINANTES UTILIZADAS EN EL SERODIAGNÓSTICO<br>DE MALARIA.....  | 35        |
| 1.6 DESARROLLO Y OBJETIVO DE LAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS .....  | 39        |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>  | <b>41</b> |
| 2.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO Y ESTAMENTO ÉTICO .....   | 41        |
| 2.2 PRODUCCIÓN DE ANTÍGENOS .....  | 42        |
| 2.3 CONTROLES SEROLÓGICOS POSITIVOS Y NEGATIVOS .....  | 43        |
| 2.4 ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA) PARA<br>LA DETECCIÓN DE INMUNOGLOBULINAS G ANTI- <i>Plasmodium vivax</i> ..... | 44        |
| 2.5 DETERMINACIÓN DEL ESTADO SEROLÓGICO Y LOS NIVELES<br>DE SEROPREVALENCIA EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO .....                           | 45        |
| 2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....  | 46        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>RESULTADOS .....</b>  | <b>48</b> |
| 3.1 NIVELES DE ANTICUERPOS EN LA POBLACIÓN .....   | 48        |
| 3.2 PUNTOS DE CORTE Y COMPARACIÓN DE LAS ESTIMACIONES DE<br>PREVALENCIA CON PvAMA-1, PvMSP-1 <sub>19</sub> Y LA QUIMERA .....  | 50        |
| 3.3 COMPARACIÓN DE LAS ESTIMACIONES DE PREVALENCIA Y ESTADO<br>SEROLÓGICO PARA LA QUIMERA Y PARA CUALQUIERA DE LOS<br>ANTÍGENOS INDEPENDIENTES (PvMSP-1 <sub>19</sub> Y/O PvAMA-1) ..... | 52        |
| <b>DISCUSIONES .....</b>   | <b>55</b> |
| <b>CONCLUSIONES .....</b>  | <b>61</b> |
| <b>RECOMENDACIONES .....</b>   | <b>62</b> |
| <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>  | <b>63</b> |
| <b>ANEXOS.....</b>   | <b>75</b> |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1.</b> Comparación de los métodos más comunes empleados en el diagnóstico e identificación de malaria. ....  | 19 |
| <b>Tabla 2.</b> Principales compuestos antimaláricos y mecanismos de acción .....   | 21 |
| <b>Tabla 3.</b> Perfil de las fases del Programa de Eliminación del Paludismo de la Organización Mundial de la Salud.....   | 26 |
| <b>Tabla 4.</b> Ventajas y desventajas de los principales indicadores de ITM utilizados en contextos de baja e inestable transmisión .....  | 29 |
| <b>Tabla 5.</b> Potenciales aplicaciones de la serovigilancia como parte de los programas de control y eliminación de malaria.....  | 32 |
| <b>Tabla 6.</b> Ventajas y desventajas de las diferentes plataformas utilizadas en las labores serovigilancia.....  | 34 |
| <b>Tabla 7.</b> Ejemplos de potenciales antígenos para su uso en estudios seroepidemiológicos de malaria por <i>P. vivax</i> ( <i>Pv</i> ) y <i>P. falciparum</i> ( <i>Pf</i> ).....                    | 36 |
| <b>Tabla 8.</b> Niveles de concordancia diagnóstica de los estados serológicos determinados con la quimera y con cualquiera de ambos antígenos independientes (PvAMA-1 y/o PvMSP-1 <sub>19</sub> )..... | 54 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Ciclo de vida y transmisión de <i>P. vivax</i> .....  | 16 |
| <b>Figura 2.</b> Países endémicos de malaria en 2000 y 2016 .....  | 18 |
| <b>Figura 3.</b> Patrones históricos de incidencia de malaria reportada en el Perú entre 1940 y 2015 .....   | 23 |
| <b>Figura 4.</b> Fases del Programa de Eliminación del Paludismo según la OMS .....  | 25 |
| <b>Figura 5.</b> Indicadores de la intensidad de transmisión de malaria (ITM).....   | 28 |
| <b>Figura 6.</b> Principales mecanismos de defensa (hospedero) y evasión (parásito) inmune en infecciones por malaria.....                                 | 31 |
| <b>Figura 7.</b> Principio básico de un ELISA indirecto .....  | 33 |
| <b>Figura 8.</b> Estructura del Antígeno Apical de Membrana 1 .....  | 37 |
| <b>Figura 9.</b> Ensamblaje y procesamiento enzimático del complejo proteico MSP-1 .....   | 38 |
| <b>Figura 10.</b> Representación esquemática de la proteína recombinante PvAMA-1/MSP-1 <sub>19</sub> .....   | 40 |
| <b>Figura 11.</b> Mapa del distrito de Mazán, Departamento de Loreto.....  | 41 |
| <b>Figura 12.</b> Niveles de anticuerpos específicos anti- <i>P. vivax</i> en habitantes del distrito de Mazán, Loreto .....                               | 49 |
| <b>Figura 13.</b> Correlación de los valores OD <sub>415nm</sub> promedio obtenidos con los diferentes antígenos .....                                     | 50 |
| <b>Figura 14.</b> Estimaciones de seroprevalencia con la quimera, PvAMA-1 y PvMSP-1 <sub>19</sub> .....  | 51 |
| <b>Figura 15.</b> Seroprevalencia para la proteína quimérica y para cualquiera de ambos antígenos independientes (PvMSP-1 <sub>19</sub> y/o PvAMA-1) ..... | 53 |

## INTRODUCCIÓN

Con presencia en 91 países y afectando más de 212 millones de personas en el 2015, malaria, o paludismo, es la enfermedad parasítica más grave en la actualidad<sup>1</sup>. De las cinco especies que causan la enfermedad en humanos, *Plasmodium vivax* es la más ampliamente extendida y la principal responsable de la morbilidad por malaria en América y el Asia, con una incidencia anual promedio de 10 millones de casos durante los años 2011 a 2015<sup>1</sup>. De acuerdo a la Dirección General de Epidemiología del Ministerio de Salud del Perú<sup>2</sup>, cerca de 50,000 casos de malaria por *P. vivax* en promedio fueron reportados en el país durante el 2015 y 2016, de los cuales alrededor del 95% se concentran en el Departamento amazónico de Loreto.

Históricamente, los esfuerzos para reducir la incidencia y diseminación de malaria en el Perú se han centrado en la región Amazónica<sup>3,4</sup>. Luego del relativo éxito del Programa Andino de Malaria en Fronteras (PAMAFRO), ejecutado entre el 2005 y el 2010, la Amazonía peruana fue considerada como una zona hipoendémica para *P. vivax*<sup>3</sup>, sin embargo, reportes recientes sugieren una marcada heterogeneidad en los patrones de transmisión de esta enfermedad<sup>4</sup>. Adicionalmente, los estudios de malaria en zonas donde no es altamente endémica o sus niveles de transmisión son inestables plantean importantes retos al actual Programa Nacional de Control de Malaria (PNCM), ya que los métodos comúnmente utilizados para la evaluación de la

exposición a la enfermedad y/o intensidad de transmisión, tradicionalmente basados en evaluaciones entomológicas o detección directa del parásito en humanos, devienen menos apropiados al ser afectados por la estacionalidad, variación de las poblaciones de mosquitos, frecuencia de muestreos del vector, sensibilidad diagnóstica, entre otros<sup>5-7</sup>. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevas estrategias y mejorar las metodologías existentes para el monitoreo de malaria y el seguimiento de intervenciones de control<sup>6</sup>.

Uno de los métodos que ha ganado gran aceptación en los últimos años para monitorear malaria en zonas hipoendémicas es el uso de marcadores serológicos<sup>5,6,8,9</sup>. Los anticuerpos, producidos como parte de la respuesta humoral del hospedero, perduran por largos periodos en la sangre luego de una infección siendo un blanco perfecto de evaluación. Los niveles de anticuerpos detectados reflejan la exposición acumulativa a los agentes etiológicos de malaria y son menos afectados por la estacionalidad debido a sus respuestas de larga duración<sup>7</sup>. De igual manera, la relativa facilidad en términos de recolección y procesamiento de muestras serológicas y el análisis de sus resultados hacen que este enfoque sea el más apropiado en áreas de baja transmisión, especialmente cuando los recursos de estudio son limitados<sup>6,8</sup>.

Diversas proteínas de *P. vivax* encontradas en su membrana celular o requeridas para la invasión eritrocitaria han sido reportadas como blanco de anticuerpos específicos producidos durante la exposición natural a la infección<sup>10-14</sup>. Dentro de este grupo, el Antígeno Apical de Membrana 1 (AMA-1) y la Proteína de Superficie del Merozoíto 1 (MSP-1) han sido propuestos

como importantes candidatos a vacuna contra estadios asexuales sanguíneos debido a su comprobada alta inmunogenicidad<sup>15-23</sup>, además, estos antígenos son comúnmente utilizados como marcadores de serovigilancia en estudios orientados a evaluar la exposición a malaria y su intensidad de transmisión<sup>5,24-29</sup>. Sin embargo, las características particulares de malaria en zonas de baja transmisión hacen necesario el uso de múltiples antígenos como la mejor manera de incrementar la sensibilidad de estudios serológicos<sup>30</sup>, esto causa que los protocolos de serodiagnóstico actuales, como el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), sean procedimientos laboriosos que demandan una considerable inversión de tiempo dado que cada suero debe ser testado contra cada uno de los antígeno considerados en el estudio.

En ese sentido, el presente trabajo de investigación evaluó y comparó el desempeño de una nueva proteína quimérica PvAMA-1/MSP-1<sub>19</sub> para estimar los niveles de seroprevalencia de malaria por *P. vivax* en la Amazonía peruana como un potencial remplazo al uso de PvAMA-1 y PvMSP-1<sub>19</sub> en ensayos independientes. Las proteínas quiméricas antigénicas de malaria han sido producidas para estimular potentes respuestas inmunes con miras al perfeccionamiento en el diseño de vacunas<sup>31-36</sup>, pero muy pocas han sido probadas en un contexto de investigación seroepidemiológica. Estas proteínas de fusión serían muy ventajosas al reducir el costo de los ensayos de laboratorio, además del tiempo y esfuerzo invertidos, lo cual es particularmente importante cuando el análisis de un gran número de muestras es requerido.

## MARCO TEÓRICO

### 1.1 GENERALIDADES DE MALARIA (PALUDISMO):

#### 1.1.1 Etiología.

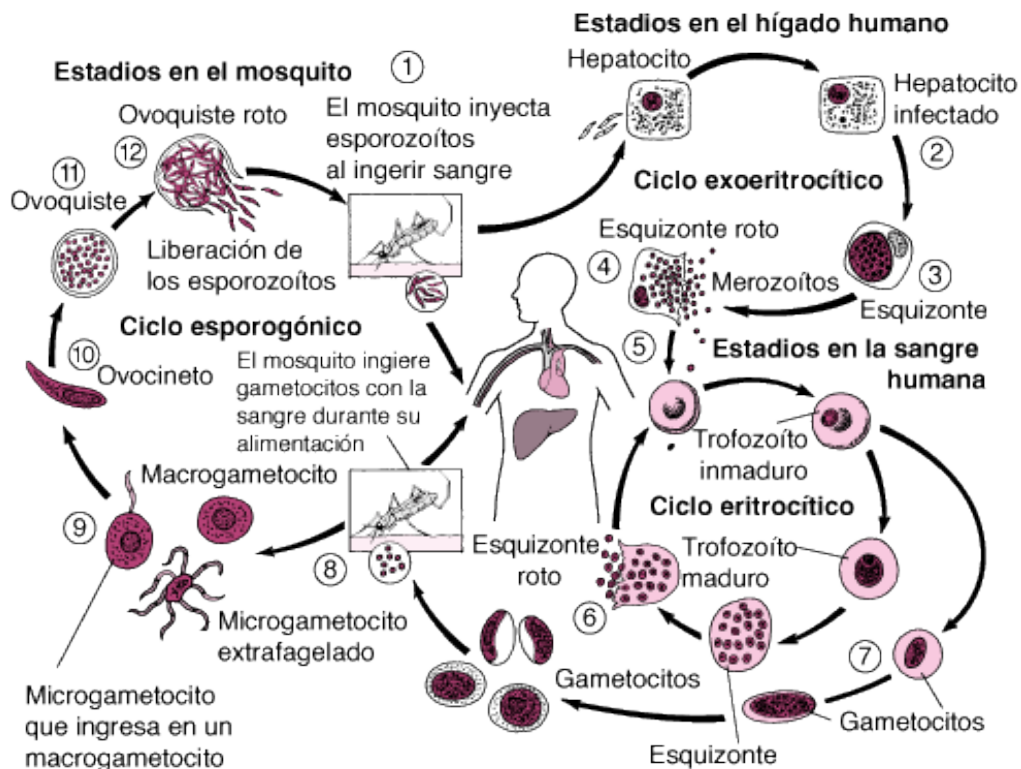
Malaria, o paludismo, es una enfermedad infecciosa causada por parásitos del género *Plasmodium* (Apicomplexa: Plasmodiidae) y es transmitida por la picadura de mosquitos *Anopheles* (Arthropoda: Culicidae) hembra infectados. De las cinco especies que ocasionan malaria en humanos (*P. falciparum*, *vivax*, *malariae*, *ovale* y *knowlesi*), *P. vivax* es el segundo agente más importante, según el número de personas infectadas, y es el principal causante de morbilidad por malaria en la mayoría de países fuera del África subsahariana<sup>1</sup>.

#### 1.1.2 Patogénesis y ciclo de vida de *Plasmodium spp.*

El proceso invasivo comienza poco después de la picadura del mosquito *Anopheles* hembra infectado (1, Figura 1). A través del torrente sanguíneo, los esporozoítos liberados alcanzan las células hepáticas donde se multiplican por esquizogonia dando origen a los merozoítos. Durante esta fase el parásito es indetectable en sangre y corresponde al estadio asintomático del huésped humano<sup>37</sup>.



Luego de la ruptura de los hepatocitos infectados, los merozoítos se dirigen nuevamente hacia el torrente sanguíneo para iniciar el ciclo eritrocítico. En esta etapa, el parásito invade los glóbulos rojos alimentándose de la hemoglobina y dividiéndose una vez más por esquizogonia. En el caso particular de *P. vivax* y *P. ovale*, algunos merozoítos reinfectan células hepáticas, y bajo ciertas condiciones, permanecen en una fase durmiente (o hipnozoíto) la cual puede generar relapsos en las posteridad<sup>37</sup>.



**Figura 1.** Ciclo de vida y transmisión de *P. vivax*. (Tomado de Pearson, 2017).

Durante el ciclo eritrocítico, la eclosión de un esquizonte conlleva a la ruptura del glóbulo rojo (6, Figura 1) lo que desencadena los principales síntomas de la

enfermedad como fiebre y escalofríos. Los merozoítos liberados invaden nuevos glóbulos rojos, mientras que otros se diferencian en gametocitos masculinos y femeninos. Un mosquito hembra adquiere el parásito cuando ingiere sangre infectada portando gametocitos, los cuales se reproducen sexualmente al interior del tracto digestivo del insecto migrando luego en forma de esporozoítos a las glándulas salivales del mismo (12, Figura 1), completando así el ciclo de vida del parásito<sup>37</sup>.

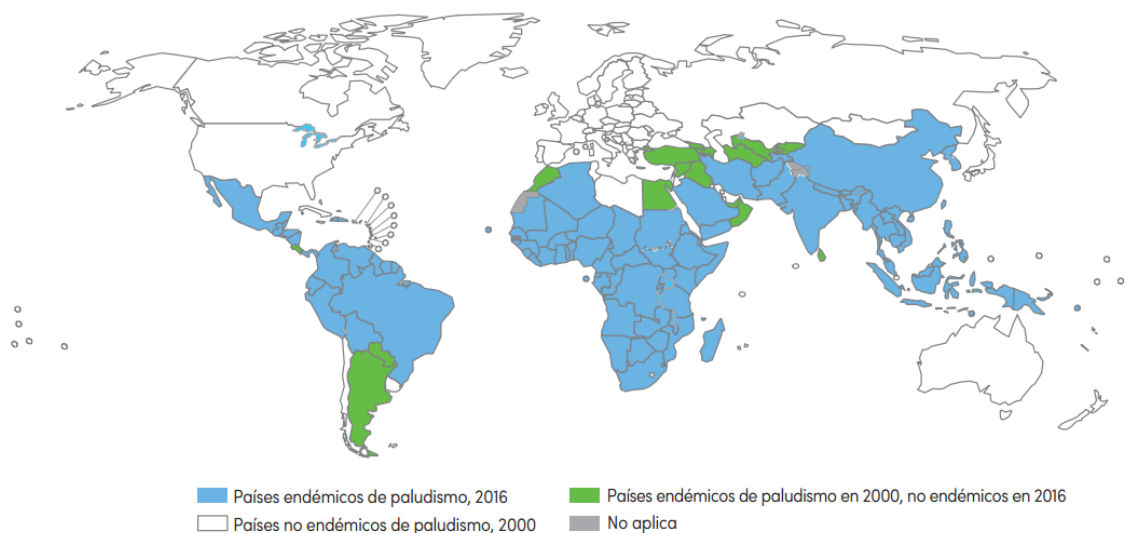
### **1.1.3 Cuadro clínico.**

Malaria se caracteriza por ser una enfermedad predominantemente febril, siendo este su síntoma cardinal. Tiene un periodo de incubación que oscila entre 9 y 40 días según la especie, durante el cual el individuo permanece asintomático. Posteriormente, síntomas como fatiga, dolor de cabeza, dolor muscular, artralgia, dolor abdominal o dolor pectoral aparecen paulatinamente. La fiebre se presenta luego alcanzando picos de 40°C en niños e individuos no inmunes<sup>39</sup>.

Típicamente, el grado máximo de exaltación de la enfermedad viene acompañado de fiebre y escalofríos en lapsos de 48 horas en *P. vivax* y *P. ovale*; y 72 horas en *P. malariae*, sin embargo, esta periodicidad es menos evidente en infecciones por *P. falciparum*. A estos síntomas se añaden diarreas, dolor de espalda, náuseas, vómitos, mialgia, palidez e ictericia. Complicaciones típicas de malaria o malaria severa incluyen alteraciones de la conciencia, postración, convulsiones múltiples, shock, edema pulmonar, hemorragia, anemia severa, insuficiencia renal, acidosis, hipoglicemia e hiperparasitemia, resultando fatal al no ser tratada<sup>37</sup>.

#### 1.1.4 Población en riesgo e incidencia.

De acuerdo al último Informe Mundial del Paludismo de la Organización Mundial de la Salud<sup>1</sup>, cerca de la mitad de la población global se encuentra en riesgo de contraer malaria, principalmente en el África subsahariana, Sudeste Asiático, Latinoamérica y Medio Oriente, sumando en la actualidad 91 países con transmisión activa (Figura 2). Además, ciertos grupos poblacionales se encuentran más propensos a desarrollar malaria severa como: infantes menores de 5 años, mujeres embarazadas, personas infectadas con VIH, viajeros, migrantes y nómades.



**Figura 2.** Países endémicos de malaria en 2000 y 2016. Tomado del Reporte Mundial del Paludismo/OMS (2016).

#### 1.1.5 Diagnóstico.

En la actualidad, el *gold standard* para el diagnóstico de malaria en el laboratorio es la microscopía óptica usando un frotis de sangre o una gota gruesa obtenidos del

individuo del cual se sospecha porte la enfermedad<sup>40</sup>. Adicionalmente, pruebas rápidas de detección de antígenos y métodos moleculares de amplificación (PCR) han venido incrementando su uso en el contexto del diagnóstico e identificación de malaria en los últimos años, sin embargo, tienden a ser más costosos que la microscopía y a requerir entrenamiento especial de operarios. En la Tabla 1, se detalla la utilidad clínica, ventajas y desventajas de los métodos comúnmente utilizados en el diagnóstico de malaria.

| Metodología   | Uso práctico  | Ventajas   | Desventajas   |
|---|---|--|---|
| <b>Microscopía</b>                                  | - Gold standard para detectar e identificar <i>Plasmodium spp.</i>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- En humanos, permite la identificación hasta el nivel de especie de todos los parásitos.</li> <li>- Permite la cuantificación de la parasitemia.</li> <li>- Más sensible que las Pruebas de Diagnóstico Rápido (PDR).</li> <li>- Relativamente barato.</li> <li>- Puede ser utilizado para monitorear el éxito del tratamiento.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Subjetivo.</li> <li>- Demora en el procesamiento puede resultar en cambios en la morfología del parásito dificultando una identificación confiable.</li> <li>- Es difícil entrenar personal para la identificación morfológica y mantener su competencia.</li> <li>- Menos sensitivo que los Métodos de Amplificación de Ácidos Nucleicos (MAAN).</li> <li>- Identificación a nivel de especie es difícil a bajas parasitemias.</li> <li>- Infecciones mixtas pueden ser no detectadas.</li> </ul> |
| <b>Test rápido de detección de antígenos (TRDA)</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Detección rápida en comparación a otros métodos (p. ej. microscopía).</li> <li>- Diagnóstico de presunción para <i>P.falciparum</i>*.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Rápida.</li> <li>- Menos subjetiva que microscopía.</li> <li>- Baja complejidad, requiere entrenamiento mínimo de operarios.</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- No es fiable para especies diferentes a <i>P. falciparum</i>*.</li> <li>- Menos sensitiva que microscopía y MAAN.</li> <li>- Generalmente necesita la confirmación por otros métodos.</li> <li>- Más cara que microscopía.</li> <li>- No es capaz de detectar cepas HRPII negativas de América del Sur.</li> <li>- No permite la cuantificación de la parasitemia.</li> <li>- No puede utilizarse para evaluar el éxito del tratamiento.</li> </ul>  |

|  |   |   |  |
|--|---|---|--|
| <b>Métodos de Amplificación de Ácidos Nucleicos (MAAN)</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Detecta infecciones mixtas**.</li> <li>- Detecta infecciones con parasitemias bajas**.</li> <li>- Capaz de identificar especies cuando la morfología del parásito es inadecuada para el análisis por microscopía.</li> <li>- Utilizada para resolver discrepancias diagnósticas entre otros métodos.</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mucho más sensible que la microscopía y TDRA**.</li> <li>- Menos subjetivo que la microscopía.</li> <li>- Permite detección e identificación a nivel de especie.</li> <li>- Superior en la detección de infecciones mixtas**.</li> <li>- Requiere menos entrenamiento del personal que la microscopía.</li> <li>- Permite cuantificación de la parasitemia (PCR en tiempo real).</li> <li>- Permite la detección de polimorfismos asociados con resistencia a drogas**.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Costoso.</li> <li>- Es un método de alta complejidad.</li> <li>- No es usual su utilización de manera inmediata.</li> <li>- Disponibilidad limitada.</li> <li>- Cuantificación puede no correlacionar con el porcentaje de parasitemia calculado usando microscopía.</li> <li>- No debería ser utilizado para evaluar el éxito del tratamiento.</li> </ul>  |
| <b>Serología</b>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Investigación epidemiológica.</li> <li>- Evaluar pacientes febriles con historial de viajes recientes a zonas endémicas que son frotis y gota gruesa negativa repetidamente.</li> <li>- Contribuir al diagnóstico de un paciente sospechoso con síndrome de esplenomegalia tropical.</li> <li>- Evaluar donantes de sangre.</li> <li>- Evaluar donantes sospechosos en casos asociados a transfusión.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Puede ser positivo en casos donde los parásitos no son detectados en frotis ni gota gruesa de sangre periférica.</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- No es apropiado para la detección de la enfermedad aguda dado el tiempo que le toma a los anticuerpos alcanzar niveles detectables en sangre.</li> <li>- Es incapaz de diferenciar infecciones previas o actuales (IgG).</li> <li>- No siempre confiable en la identificación a nivel de especies.</li> <li>- Son laboriosos y se tarda en obtener los resultados.</li> <li>- No siempre disponible con excepción de ciertos laboratorios de referencia.</li> </ul> |

**Tabla 1.** Comparación de los métodos más comunes empleados en el diagnóstico e identificación de malaria (\*depende del kit utilizado; aplicable a la prueba de malaria BinaxNOW®, \*\*depende del método utilizado). Adaptado de Mathinson (2017).

### 1.1.6 Tratamiento.

Los métodos recomendados por la OMS<sup>41</sup> para el tratamiento de malaria no complicada y malaria severa (*P. vivax* o *P. falciparum*) incluyen terapias basadas en derivados sintéticos de la artemisina y de la quinina (Tabla 2), ambos compuestos naturales obtenidos de la hierba *Artemisia annua* (Magnoliophyta: Asteraceae) y de diferentes especies arbóreas del género *Cinchona* (Magnoliophyta: Rubiaceae) respectivamente.

Durante las últimas décadas, se ha reportado la aparición y extensión de cepas resistentes a los derivados de la artemisina (en el caso de *P. falciparum*) y de la quinina (*P. vivax*) lo cual representa un importante reto en las estrategias para el control y la erradicación de malaria en el futuro. El último Informe Mundial del Paludismo<sup>1</sup> sugiere el uso de terapias combinadas para un mayor éxito en el tratamiento.

| Clase                                   | Mecanismo de Acción  | Antipalúdicos   |
|---|--|---|
| <b>Drogas esquizonticidas (sangre).</b> | Actúa en el ciclo eritrocítico del parásito interrumpiendo los signos clínicos de la enfermedad.                                     | Quininas, artemisinas, amodiaquina, cloroquina, lumefantrina, tetraciclina, atovaquona, sulfadoxina, clindamicina, proguanil. |
| <b>Drogas esquizonticidas (tejido).</b> | Actúa en las formas primarias de <i>Plasmodium</i> spp. afectando tejido hepático. Bloquea el posterior desarrollo de la enfermedad. | Primaquina, pirimetamina, proguanil, tetraciclina.  |
| <b>Drogas gametocitocidas.</b>          | Destruye formas sexuales del parásito previniendo así la transmisión de la infección en mosquitos.                                   | Primaquina, artemisina, quinina.  |
| <b>Drogas hipnozoitocidas.</b>          | Actúa en formas hepáticas persistentes (hipnozoítos) de <i>P. vivax</i> y <i>P. ovale</i> .  | Primaquina, tafenoquina.  |

| Drogas esporonticidas. | Actúan afectando el desarrollo posterior de los gametocitos en ovocineto. | Primaquina, cloroguanil. | proguanil y |
|------------------------|---|--------------------------|-------------|
|------------------------|---|--------------------------|-------------|

**Tabla 2.** Principales compuestos antimaláricos y mecanismos de acción. Adaptado de Directrices para el Tratamiento de la Malaria, OMS (2013).

## 1.2 CONTEXTO ACTUAL DE MALARIA EN EL PERÚ:

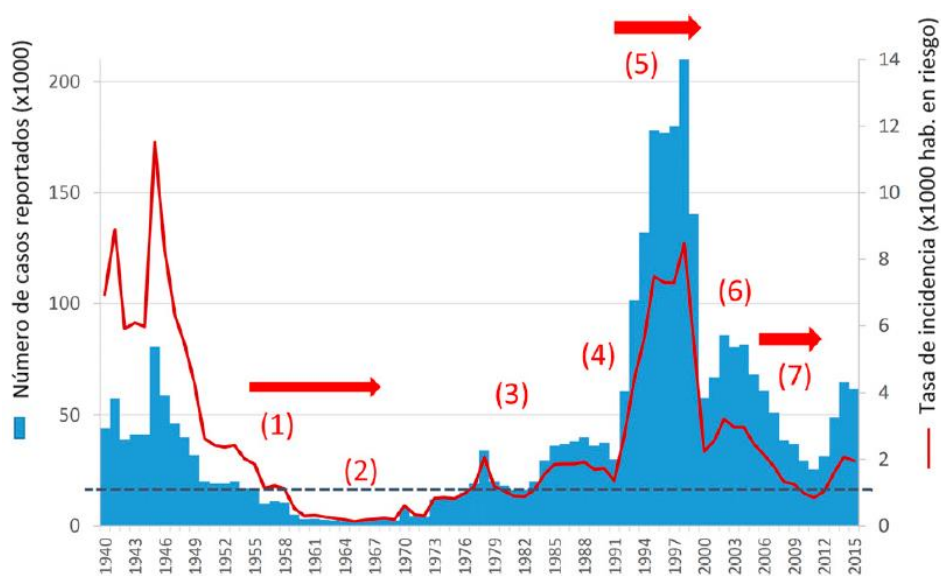
La llegada de malaria a Sudamérica y al Perú se remonta a los tiempos de la Conquista Española y a la época Colonial<sup>42,43</sup>, sin embargo, esta enfermedad continúa siendo un problema de salud importante en nuestros días. Según cifras oficiales de la Dirección General de Epidemiología del Ministerio de Salud del Perú<sup>2</sup>, alrededor de 50,000 casos de malaria por *P. vivax* y 14,000 por *P. falciparum* fueron registrados en promedio durante el 2015 y 2016, de los cuales cerca del 95% se concentran en el Departamento de Loreto en la Amazonía Peruana.

Múltiples esfuerzos se han enfocado en el control y erradicación de malaria en el Perú durante el último siglo. En el año 1957, se crea el primer Programa Nacional de Erradicación de la Malaria que lidió con un área malarígena que se extendía al 75% del territorio nacional (961,200 km<sup>2</sup>), comprendiendo los valles costeros hasta los 2000 msnm, los valles interandinos bajo los 2300 msnm y las selvas alta y baja. Para 1968, el programa logró reducir el área de extensión de la enfermedad en un 86% y la población en riesgo de adquirirla en un 97%<sup>43</sup>.

De 1969 en adelante el Programa Nacional de Erradicación, posteriormente Control, de la Malaria se deterioró progresivamente debido a recortes presupuestarios hasta

quedar prácticamente desactivado<sup>43</sup>, encontrándose para la década de los 80', incapaz de realizar intervenciones de control y eliminación debido a no contar con una estructuración adecuada<sup>4,42</sup>.

De manera predecible, malaria resurgió durante los años 90' asociada a la expansión de *Anopheles darlingi* en la Amazonía y a la aparición de cepas de *P. falciparum* resistentes a la cloroquina y de *P. vivax* resistentes a la cloroquina y a la sulfadoxina-pirimetamina. Del mismo modo, las intensas lluvias e inundaciones causadas por el Fenómeno “El Niño” en los años 1997-1998, crearon condiciones idóneas para el desarrollo del vector y la transmisión de la enfermedad alcanzando niveles pandémicos que sobrepasaron los 200,000 casos a nivel nacional<sup>4</sup> (5, Figura 3).



**Figura 3.** Patrones históricos de incidencia de malaria reportada en el Perú entre 1940 y 2015: (1) 1957-1968, Programa Nacional de Erradicación de la Malaria; (2) 1965, 1500 casos; (3) 1980, intervenciones de control en los centros de salud; (4) 1990, primer reporte de malaria por *P.falciparum* en Loreto; (5) Fenómeno “El Niño” de 1997-1998; (6) 2001-2003, introducción de ACTs; (7) 2005-2010, PAMAFRO. Tomado de Rosas-Aguirre (2016).



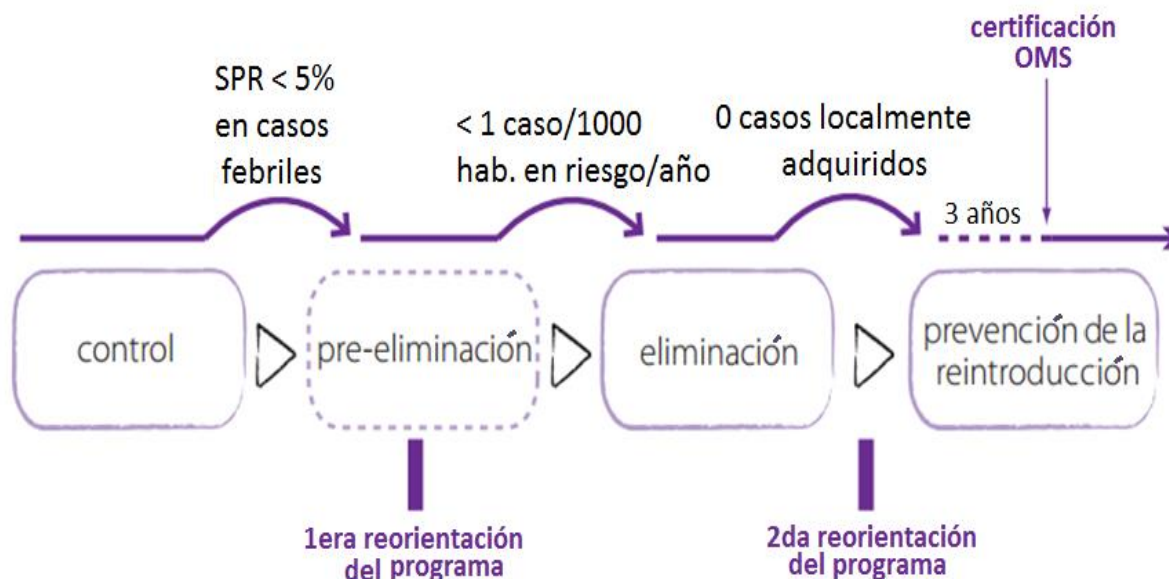
La introducción de terapias combinadas con artemisinina (ACTs) contra *P. falciparum* y el régimen de corta duración (7 días) de primaquina contra *P. vivax*, junto con acciones focalizadas de control de brotes, lograron reducir y estabilizar la incidencia anual de malaria a 50,000 casos en promedio entre el 2000 y el 2005, año en el cual el Programa Andino de Malaria en Fronteras (PAMAFRO), avalado por el Fondo Mundial para la Lucha contra Malaria (*The Global Fund*), comenzó sus actividades en el país<sup>44</sup>.

Las intervenciones de PAMAFRO fueron relativamente exitosas, logrando disminuir el número de casos de malaria de 87,673 en el 2005 a 23,060 en el 2011, según datos del Ministerio de Salud del Perú<sup>2</sup>. Desafortunadamente, la reducción en el soporte económico brindado a las actividades de control ha propiciado un incremento alarmante en la incidencia anual de malaria durante los últimos años, alcanzando picos de 65,239 y 63,153 casos durante el 2014 y 2015 respectivamente.

El panorama actual de las infecciones por malaria sitúa a *P. vivax* como la especie de mayor prevalencia en el país, superando por un ratio de 4:1 a las infecciones causadas por *P. falciparum*<sup>42</sup>. Además, múltiples estudios<sup>4,45-47</sup> sugieren la existencia de una larga proporción de infecciones asintomáticas y sub-microscópicas en la Amazonía peruana constituyéndose como un reservorio importante de la enfermedad. De igual manera, se ha reportado una elevada heterogeneidad en los patrones de exposición y prevalencia de malaria entre comunidades amazónicas, lo cual plantea importantes retos al actual Programa Nacional de Control de Malaria (PNCM).

### 1.3 IMPORTANCIA DE LOS ESTUDIOS DE EXPOSICIÓN E INTENSIDAD DE TRANSMISIÓN DE MALARIA (ITM) EN EL PERÚ:

El Programa de Eliminación del Paludismo de la Organización Mundial de la Salud presenta cuatro etapas: (1) la fase de control, (2) la pre-eliminación, (3) la eliminación y (4) la prevención de la reintroducción de malaria<sup>48</sup> (Figura 4). Cada una de estas fases está regida por un conjunto de recomendaciones, objetivos e hitos orientados a prevenir, tratar, vigilar, monitorear y evaluar la infección, así como también, fortalecer los sistemas de salud (Tabla 3).



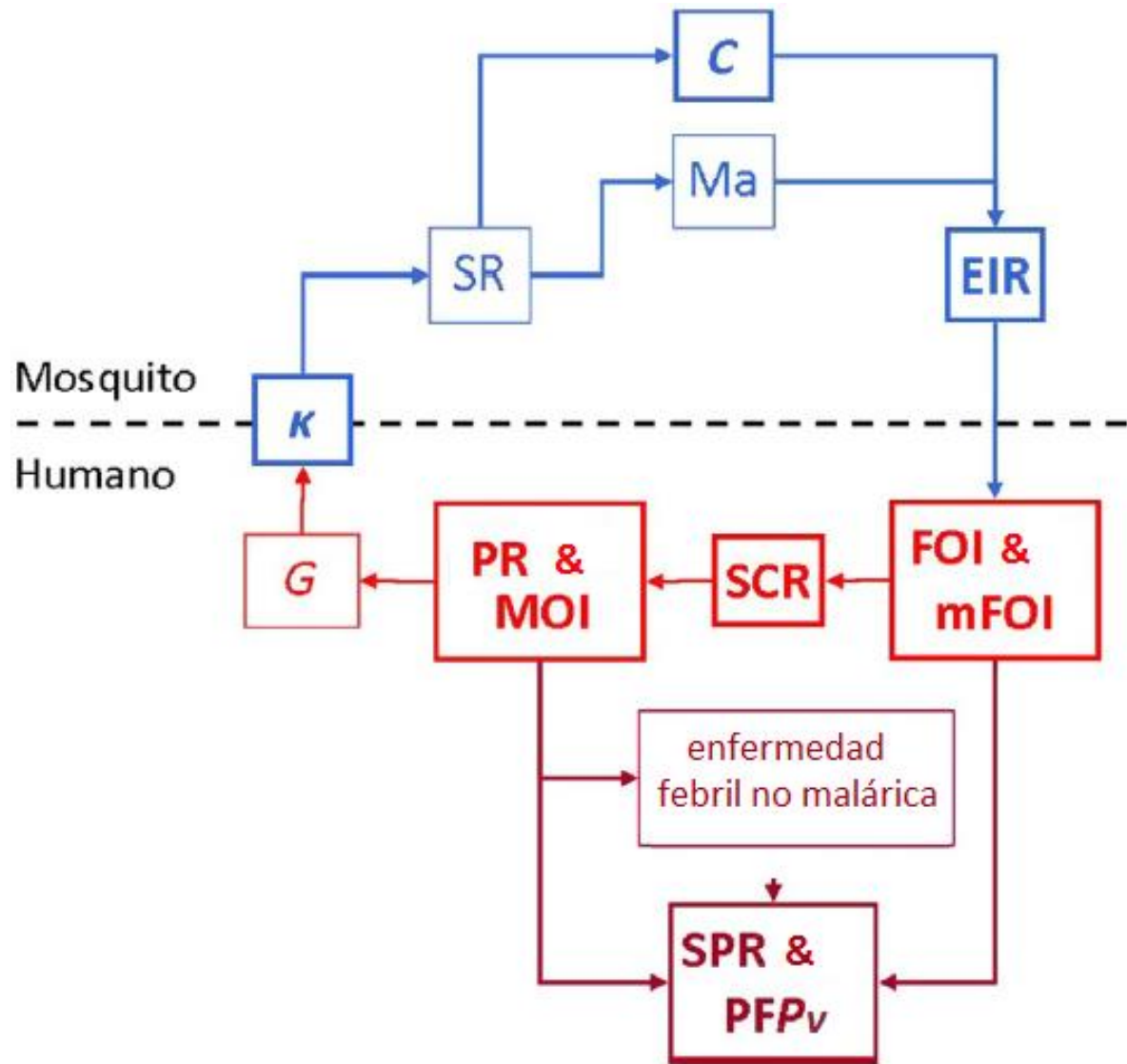
**Figura 4.** Fases del Programa de Eliminación del Paludismo según la OMS. SPR: Láminas o pruebas rápidas positivas. Los hitos de paso entre una fase y otra son puramente indicativos; en la práctica esta transición dependerá de la incidencia de la enfermedad que los programas puedan manejar realmente. Adaptado del Reporte Mundial del Paludismo/OMS (2015).

| ITEM / FASE   | 1. CONTROL   | 2. PRE-ELIMINACIÓN   | 3. ELIMINACIÓN   | 4. PREVENCIÓN DE LA REINTRODUCCIÓN   |
|---|--|--|--|--|
| OBJETIVO PRINCIPAL  | Reducir morbilidad y mortalidad.   | Interrumpir la transmisión local a en el país.   | Interrumpir la transmisión local a en el país.   | Prevenir el restablecimiento de la transmisión local.                                    |
| META EPIDEMIOLÓGICA   | Reducir la incidencia de malaria.  | Reducir el número de focos activos a cero.<br>Reducir el número de casos localmente adquiridos a cero.                   | Reducir el número de focos activos a cero.<br>Reducir el número de casos localmente adquiridos a cero. | Prevenir que los casos introducidos originen casos autóctonos (locales).                 |
| META DE TRANSMISIÓN   | Reducir la intensidad de transmisión.  | Reducir la retransmisión de los casos existentes.  | Reducir la retransmisión de los casos existentes.  | Reducir la retransmisión de los casos importados.  |
| UNIDAD DE INTERVENCIÓN  | A nivel de país o de área.   | Focos de transmisión.  | Focos de transmisión, casos individuales (adquiridos localmente e importados).                         | Focos recientes de transmisión (áreas receptoras), casos individuales (sólo importados). |
| HITOS INDICATIVOS DE LA TRANSICIÓN A LA SIGUIENTE FASE DEL PROGRAMA | SPR < 5% en presuntos casos de malaria.  | < 1 caso por año en 1000 habitantes en riesgo de contraer malaria.   | Cero casos adquiridos localmente.  |  |
| FUENTE DE DATOS PARA MEDIR EL AVANCE HACIA LOS HITOS                | <u>Datos indirectos:</u><br>Datos del centro médico.<br><u>Datos de confirmación:</u><br>Encuesta poblacional. | <u>Datos indirectos:</u><br>Datos del centro médico, reportes.<br><u>Datos de confirmación:</u><br>Encuesta poblacional. | Reportes, investigaciones de casos individuales, genotipificación.                                     |  |

**Tabla 3.** Perfil de las fases del Programa de Eliminación del Paludismo de la Organización Mundial de la Salud. SPR: Láminas o pruebas rápidas positivas. Los hitos de paso entre una fase y otra son puramente indicativos; en la práctica esta transición dependerá de la incidencia de la enfermedad que los programas puedan manejar realmente. Adaptado del Reporte Mundial del Paludismo/OMS (2015).

En nuestro contexto, el Perú se ubica en el conjunto de países cuyos esfuerzos se enmarcan en la Fase de Control de la enfermedad<sup>1</sup>, en la cual, las labores de monitoreo y vigilancia de la exposición a malaria y de su intensidad de transmisión son imprescindibles, ya que permiten estimar la incidencia de las infecciones, planificar y reorientar las estrategias de control, y evaluar el impacto de las intervenciones en poblaciones expuestas. En efecto, los sistemas de monitoreo y vigilancia ayudan a las autoridades decisorias a reducir la transmisión de malaria al proveer información sobre cuales son las poblaciones con mayor incidencia de la enfermedad, y por ende, hacia quienes deben ser orientados los recursos. Además, proveen información sobre aquellos cambios de la incidencia de malaria en el tiempo que requieren atención<sup>49</sup>.

Sin embargo, las características particulares de malaria en zonas hipoendémicas de transmisión inestable, estacional y heterogénea, como la Amazonía peruana<sup>50</sup>, hacen que los métodos tradicionales para la evaluación de la transmisión, basados en indicadores entomológicos o en la detección del parásito en humanos (Figura 5), devengan menos sensibles y fiables, haciéndose necesario desarrollar nuevas estrategias e implementar las metodologías ya existentes. La Tabla 4 presenta las ventajas y desventajas de los principales indicadores utilizados para evaluar ITM en contextos de baja transmisión.



**Figura 5.** Indicadores de la intensidad de transmisión de malaria (ITM). En azul se muestran los indicadores entomológicos y en rojo los indicadores clínicos (rojo oscuro refiere las infecciones sintomáticas y asintomáticas identificadas en centros de salud).  $K$ : tasa de infectividad,  $SR$ : tasa de esporozoítos,  $C$ : capacidad vectorial,  $Ma$ : tasa de picadura humana,  $EIR$ : tasa de inoculación entomológica,  $FOI$ : fuerza de infección,  $mFOI$ : fuerza molecular de infección,  $SCR$ : tasa de seroconversión,  $PR$ : tasa de parásitos,  $MOI$ : multiplicidad de infección,  $G$ : tasa de gametocitos,  $SPR$ : índice de láminas positivas y  $PFP_v$ : proporción de fiebres parasitarias. Adaptado de Tusting *et al* (2014).

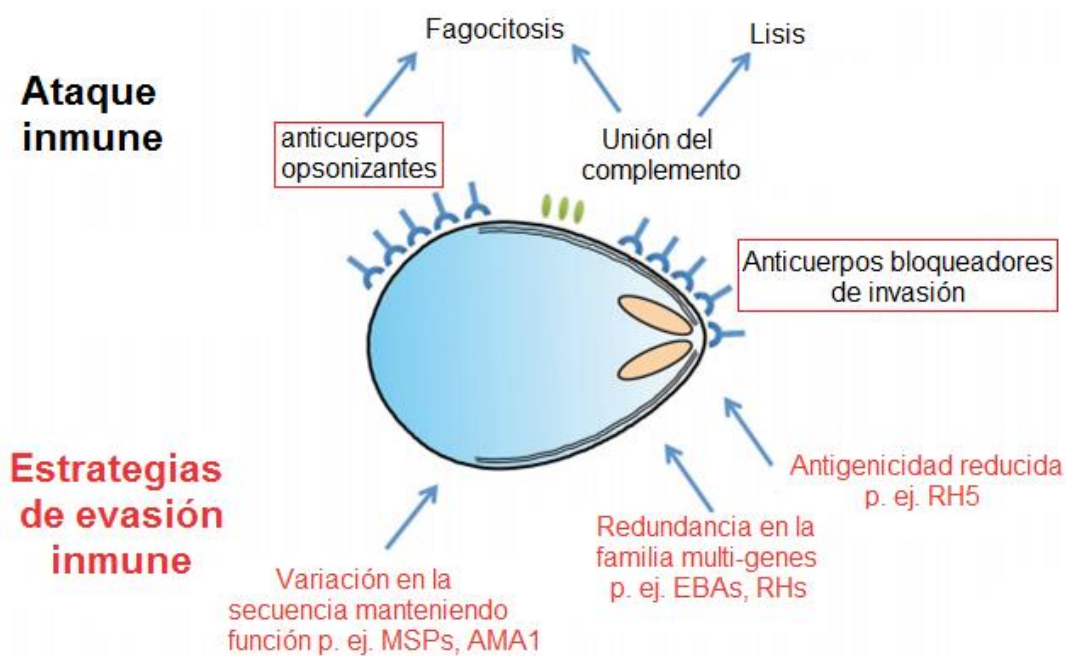
| INDICADOR   | VENTAJAS   | DESVENTAJAS   |
|---|--|---|
| Tasa de inoculación entomológica (EIR).                           | <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Gold standard</i> para la medición de la intensidad de transmisión de malaria.</li> <li>- Utilizado para la toma de decisiones.</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Validez afectada por la variabilidad espacial, temporal y estacional de las densidades del vector.</li> <li>- Variación en los métodos de muestreo de mosquitos.</li> <li>- Recopilación de datos requiere muchos recursos y es laboriosa.</li> </ul>  |
| Tasa de incidencia de malaria clínica confirmada por microscopía. | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Obtenida por las rutinas de vigilancia.</li> <li>- Capaz de ser integrada con otros datos programáticos.</li> <li>- Utilizada para la toma de decisiones.</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Validez afectada por factores que influyen la efectividad de DPC* y notificaciones de casos, p. ej. alta proporción de casos asintomáticos, acceso a centros de salud, comportamiento de búsqueda de tratamiento, calidad del diagnóstico microscópico, sistemas de información, etc.</li> </ul> |
| Tasa de parásitos (PR).   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Utilizada comúnmente como indicador de endemicidad.</li> <li>- Indicador obtenido de encuestas e investigaciones transversales.</li> <li>- Utilizada para la toma de decisiones.</li> <li>- Provee información sobre infecciones activas.</li> </ul>                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Validez afectada por la sensibilidad de la prueba diagnóstica utilizada.</li> <li>- Afectada por variaciones estacionales.</li> <li>- Se requiere un gran número de muestras a bajos niveles de infección (costos y recursos se incrementan).</li> </ul>   |
| Tasa de seroconversión (SCR).                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Fácil colección de muestras durante estudios transversales.</li> <li>- Las técnicas de laboratorio requeridas para su análisis son baratas.</li> <li>- Provee información sobre infecciones pasadas.</li> <li>- Menos afectada por variaciones estacionales.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Aún no es utilizada para la toma de decisiones.</li> <li>- Requiere previa validación de múltiples antígenos para la detección de anticuerpos.</li> </ul>  |

**Tabla 4.** Ventajas y desventajas de los principales indicadores de ITM utilizados en contextos de baja e inestable transmisión. Tomado de Rosas-Aguirre (2015).

#### **1.4 MARCADORES SEROLÓGICOS COMO INDICADORES DE EXPOSICIÓN E ITM EN ZONAS DE BAJA TRANSMISIÓN:**

Uno de los métodos que ha adquirido gran aceptación en los últimos años para realizar labores de monitoreo y vigilancia de la ITM en áreas de transmisión baja e inestable, es el uso de marcadores serológicos. Estos son usualmente utilizados para evaluar la exposición de las poblaciones al parásito y estimar la tasa de seroconversión (SCR: tasa en la cual individuos seronegativos devienen seropositivos) de sus habitantes<sup>7</sup>, y cuentan además con una muy fuerte correlación con otros indicadores como la tasa de inoculación entomológica (EIR), *gold standard* actual para la evaluación de ITM<sup>51</sup>.

En zonas endémicas, la exposición natural a la infección induce una fuerte respuesta humoral caracterizada por la producción de altos títulos de anticuerpos IgG e IgM, siendo una parte de estos especie-, pero también, estadio-específicos, los cuales reaccionan con un amplio espectro de antígenos del parásito<sup>52</sup>. Las respuestas inmunes mediadas por anticuerpos perduran por largos periodos en la sangre luego de una infección, consolidándose como un blanco perfecto de evaluación (Figura 6).



**Figura 6.** Principales mecanismos de defensa (hospedero) y evasión (parásito) inmune en infecciones por malaria. Los merozoítos son la principal etapa extracelular del patógeno, y por ende, están expuestos al ataque orquestado del sistema inmune del hospedero. Por ejemplo, los antígenos del merozoíto son reconocidos por anticuerpos quienes median la eliminación del parásito, la detección de estos anticuerpos es la base de múltiples pruebas serológicas en estudios de exposición e ITM. Tomado de Wright & Rayner, 2014.

El uso de marcadores serológicos como herramientas de vigilancia y monitoreo ha demostrado ser rentable y confiable en la reducción de la transmisión de malaria<sup>51</sup>. Su robustez en la detección de variaciones de corto y largo plazo en los patrones de transmisión, así como su relativa sencillez y bajo costo en los procedimientos de laboratorio requeridos para su análisis, han impulsado su utilización en contextos de recursos económicos limitados<sup>51</sup>. Quizás la ventaja más importante que ofrece la serología como herramienta de estudio de la ITM es que debido a larga duración de las respuestas humores, la seroprevalencia resulta menos afectada por la estacionalidad y



por fluctuaciones de corta duración en la transmisión a comparación de otros indicadores (EIR, PR, etc.)<sup>7</sup>.

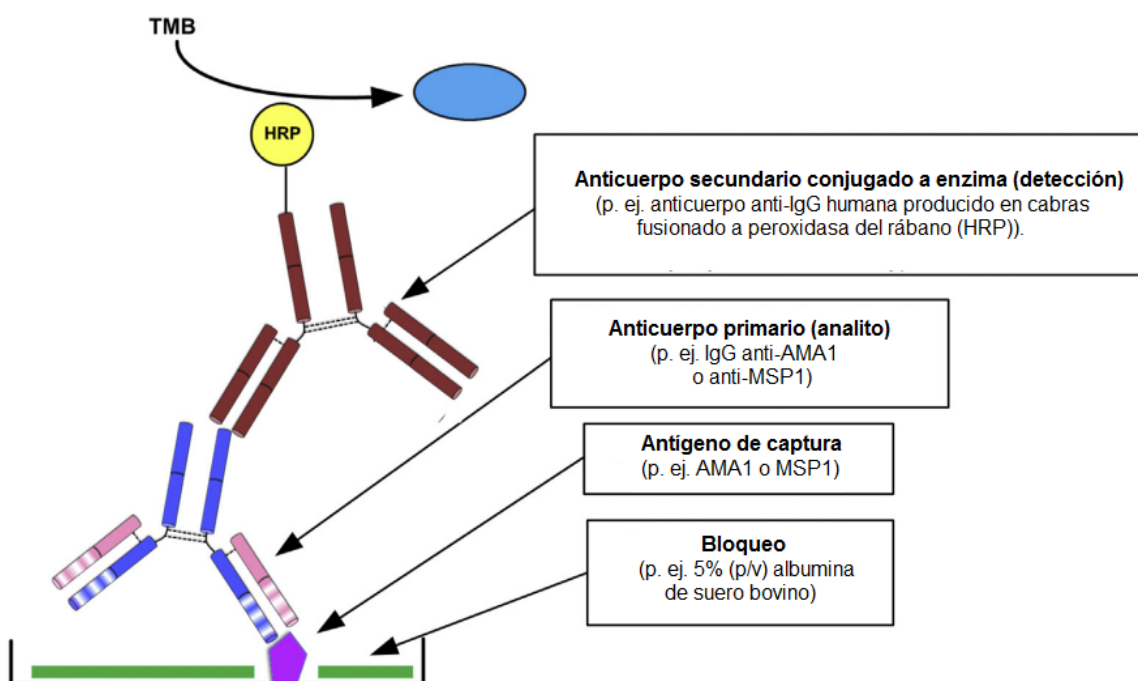
Los estudios seroepidemiológicos brindan además múltiples potenciales aplicaciones en el contexto de control y eliminación de malaria (Tabla 5). Se ha demostrado, por ejemplo, que la serología es útil para la identificación de áreas focalizadas de infección y grupos poblacionales en riesgo<sup>30</sup>. A medida que la transmisión decae, se vuelve muy heterogénea, concentrándose en determinadas áreas geográficas (*hot-spots*) y en subpoblaciones de alto riesgo (*hot-pops*). De manera paralela, la proporción de individuos con infecciones submicroscópicas se incrementa, contribuyendo sustancialmente a la transmisión en curso<sup>30</sup> lo cual constituye un desafío importante en la eliminación de los reservorios residuales.

| APLICACIÓN  |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Estimar el nivel de transmisión de malaria en poblaciones.</li> <li>• Monitorear tendencias en la transmisión de malaria en largos periodos (años).</li> <li>• Evaluar el impacto de las intervenciones de control.</li> <li>• Identificar individuos y poblaciones con exposición reciente (varios meses).</li> <li>• Identificar áreas de infección focalizada (<i>hot-spots</i>) o poblaciones (<i>hot-pops</i>) con transmisión activa.</li> <li>• Confirmar la eliminación de malaria y monitorear su reemergencia.</li> <li>• Detectar portadores asintomáticos de la infección.</li> <li>• Identificar poblaciones en alto riesgo.</li> </ul> |

**Tabla 5.** Potenciales aplicaciones de la serovigilancia como parte de los programas de control y eliminación de malaria. Tomado de Elliot *et al* (2014).

Múltiples plataformas o metodologías (Tabla 6) están siendo actualmente exploradas para su utilización en labores de serovigilancia (definida como el uso de anticuerpos especie-específicos a modo de biomarcadores para el monitoreo de

exposición, transmisión e inmunidad<sup>30</sup>), sin embargo, el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) indirecto (Figura 7) se ha consolidado como la técnica más ampliamente utilizada para la medición de los niveles de inmunoglobulinas antimalaria<sup>7</sup>. El ensayo se caracteriza además por ser una técnica de bajo costo, estandarizable, de alto rendimiento, fácil de realizar y de alta reproducibilidad<sup>54</sup>.



**Figura 7.** Principio básico de un ELISA indirecto. El ensayo comienza con el tapizado de la superficie de los pocillos de una placa con el antígeno recombinante de captura. Luego, esta superficie es bloqueada para evitar uniones inespecíficas. Más adelante, la placa es incubada con el suero a evaluar, donde los anticuerpos presentes se unirán eventualmente al antígeno de captura. Una solución conteniendo anticuerpos secundarios conjugados a enzima se adiciona para reconocer los analitos. Finalmente, la reacción es revelada al agregar la solución substrato TMB (*tetrametilbencidina*) produciendo una señal colorimétrica que puede ser leída para cuantificar los niveles de anticuerpos antimalaria presentes en la muestra. Adaptado de Okennedy *et al* (2017).

A pesar de los avances tecnológicos que han logrado convertir a la serología en una herramienta confiable y robusta en zonas de transmisión baja, estacional e inestable, se hace necesario aún el proceso de estandarización de los protocolos y antígenos utilizados en los diferentes estudios<sup>8</sup>. De igual manera, dado que diferentes epítopes desencadenan respuestas humores de magnitudes y cinéticas diferentes, es altamente recomendable la inclusión de múltiples antígenos en las evaluaciones serológicas para poder evaluar los diferentes patrones de transmisión y exposición con mayor precisión<sup>54</sup>.

| PLATAFORMA   | VENTAJAS   | DESVENTAJAS   | COMENTARIOS  |
|--|--|---|--|
| ELISA  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Técnica consolidada y ampliamente utilizada.</li> <li>• Eficiente y de alto rendimiento.</li> <li>• Relativamente barato.</li> <li>• No requiere gran experiencia técnica por parte de los operarios.</li> <li>• Tecnología semiautomática disponible.</li> <li>• Permite utilizar ELISA de competición para medir la unión de anticuerpos a distintos variantes alélicas de los epítopes.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Típicamente evalúa un solo antígeno cada vez.</u></li> <li>• Requiere facilidades de laboratorio.</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Idóneo para su uso en laboratorios de referencia.</li> <li>• Puede ser adaptado para su uso por equipos encuestadores con equipo portátil.</li> </ul> |
| Ensayo basados en micro-esferas ( <i>bead-based assays</i> ) | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Eficiente y de alto rendimiento.</li> <li>• Capaz de probar múltiples respuestas antígeno-específicas simultáneamente.</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Relativamente costoso.</li> <li>• Requiere un alto grado de experiencia técnica en los operarios.</li> <li>• Requiere facilidades de laboratorio.</li> <li>• Requiere una extensa optimización de las microesferas tapizadas con antígenos.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Idóneo para su uso en laboratorios de referencia.</li> </ul>  |

|  |   |   |   |
|--|---|---|---|
| Microarrays de proteínas.                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Capaz de evaluar niveles de anticuerpos para un extenso arreglo de antígenos (decenas o cientos).</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Costoso.</li> <li>• Requiere un muy alto grado de experiencia técnica en los operarios.</li> <li>• Requiere facilidades de laboratorio.</li> <li>• Requiere la producción de un gran número de antígenos.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Usado actualmente en el descubrimiento de nuevos antígenos.</li> <li>• Podría ser propicio para su uso en laboratorios de referencia.</li> </ul> |
| Pruebas de diagnóstico en punto de atención. | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Permite la evaluación en comunidades o en el centro de salud.</li> <li>• El resultado se obtiene en minutos proveyendo información en tiempo real a los operarios y participantes.</li> <li>• No se requiere experiencia técnica previa o facilidades de laboratorio.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Limitado a evaluar dos o tres antígenos.</li> <li>• Es una metodología semi-cuantitativa.</li> <li>• Sensibilidad inferior que otros métodos.</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Técnica recomendable para evaluaciones a nivel de comunidades y para su uso en laboratorios de referencia.</li> </ul>                            |

**Tabla 6.** Ventajas y desventajas de las diferentes plataformas utilizadas en las labores serovigilancia. Tomado de Elliot *et al* (2014).

## 1.5 PROTEÍNAS RECOMBINANTES UTILIZADAS EN EL SERODIAGNÓSTICO DE MALARIA:

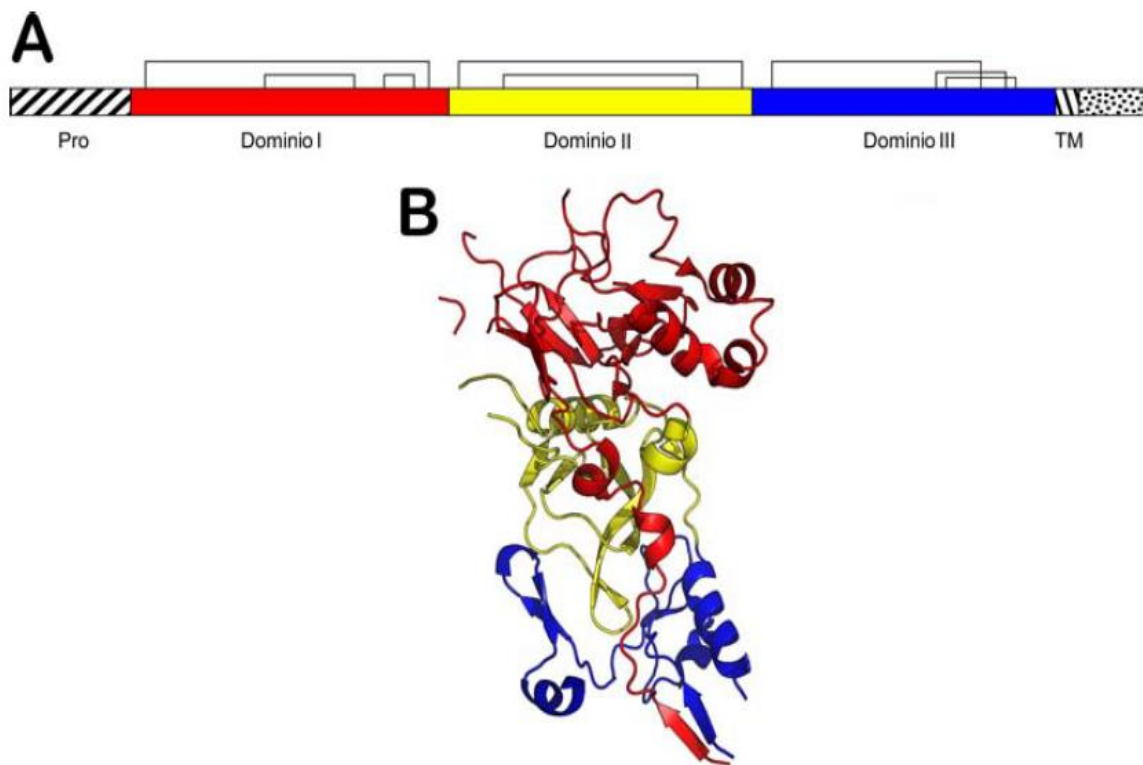
Algunas de las proteínas constituyentes de la superficie celular de *P. vivax* y *P. falciparum*, expresadas durante el estadio asexual de su ciclo eritrocítico, han sido sugeridas como potenciales candidatas a vacunas, y varios estudios en áreas endémicas han referido su reconocimiento por anticuerpos específicos producidos por la exposición a la infección (Tabla 7)<sup>10-14,56</sup>. Dentro de este grupo de moléculas de la membrana celular del parásito destacan AMA-1 (Antígeno Apical de Membrana 1) y MSP-1 (Proteína de

Superficie del Merozoíto 1), antígenos recombinantes que son constantemente utilizados en estudios de evaluación de exposición e ITM en zonas de baja transmisión<sup>5,24-29</sup>.

|   | AMA1  | CSP  | MSP1 <sub>19</sub>   | MSP3   |
|---|---|--|--|--|
| Identidad entre las secuencias de <i>Pf</i> y <i>Pv</i> . | 51% (ecto-dominio).   | 25%.   | 45%.   | 20% (C-terminal).  |
| Polimorfismos.  | >10% de los amino-ácidos del ectodominio en PfAMA-1 y PvAMA-1 son polimórficos. Anticuerpos también reconocen epítopes en reacción cruzada. | Grado sustancial de polimorfismo. Terminales C y N son relativamente conservados y flanquean una altamente polimórfica región central repetida.                        | Limitado polimorfismo. PfMSP-1 <sub>19</sub> tiene cuatro residuos polimórficos. | Grado sustancial de polimorfismo. PfMSP-3 tiene un dominio central polimórfico. PvMSP-3α presenta polimorfismo a lo largo de su secuencia. |
| Reactividad cruzada de los anticuerpos entre especies.    | Cierto grado de reactividad cruzada detectada con anticuerpos producidos en animales.   | Desconocida.   | Desconocida.   | Desconocida.   |
| Comentarios   | 1. PfAMA-1 y PvAMA-1 son candidatos a vacunas   | 1. Principal candidato a vacuna, lo que puede imposibilitar su uso en serovigilancia en el futuro.<br>2. Su potencial en labores de serovigilancia ha sido demostrado. | 1. Su potencial en labores de serovigilancia ha sido demostrado.                 | 1. Muestra ser inmunogénico en muchas poblaciones y contextos.<br>2. PfMSP-3 se encuentra actualmente en ensayos clínicos.                 |

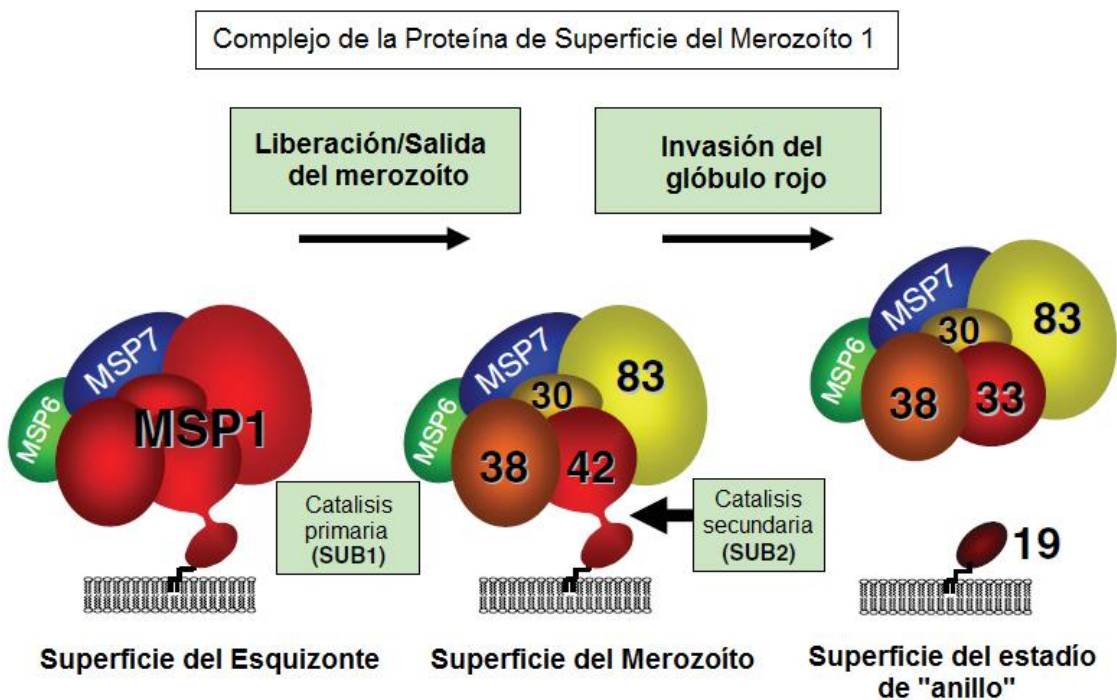
**Tabla 7.** Ejemplos de potenciales antígenos para su uso en estudios seroepidemiológicos de malaria por *P. vivax* (*Pv*) y *P. falciparum* (*Pf*). Tomado de Elliot *et al* (2014).

AMA-1 es una proteína de origen micronemal que ha sido ampliamente estudiada debido a su potencial como candidata a vacuna contra malaria, además múltiples estudios sugieren que su ectodominio (AMA-1<sub>66</sub>) es un agente altamente inmunogénico<sup>15-18,57,58</sup> y que desarrolla un rol fundamental durante el proceso de invasión de los glóbulos rojos por parte de los merozoítos<sup>24,59-64</sup> siendo una proteína clave en el proceso de unión al eritrocito<sup>65,66</sup> y en el de reorientación de los merozoítos sobre la superficie de los glóbulos rojos<sup>64</sup>.



**Figura 8.** Estructura del Antígeno Apical de Membrana 1. **A.** Representación gráfica de la estructura primaria de AMA-1 y sus tres dominios. **B.** Estructura del ectodominio (AMA-1<sub>66</sub>) de *P. vivax* (los colores concuerdan con la estructura primaria). Tomado de MacRail *et al* (2011).

De otro lado, MSP-1 también ha sido postulada como un importante antígeno candidato a vacuna, debido a ser una de las proteínas más abundantes de la membrana celular del parásito y a su comprobada inmunodominancia<sup>19-23,68-72</sup>. MSP-1<sub>19</sub> es un subproducto de 19kDa de la región C-terminal resultante de una catálisis enzimática secundaria de la proteína MSP-1<sup>11,73-75</sup> (Figura 9); es el único fragmento que queda anclado a la superficie del merozoíto al momento de la invasión eritrocitaria y del cual se señala ser altamente inmunogénico durante la infección natural en humanos<sup>22,57,76-78</sup>.



**Figura 9.** Ensamblaje y procesamiento enzimático del complejo proteico MSP-1. MSP-1 es sintetizado y se asocia a diferentes proteínas (MSP-6 y MSP-7) en la superficie del esquizonte en desarrollo. Cuando el merozoíto es liberado el complejo es clivado en una serie de fragmentos por la proteasa SUB1 (a modo de aclaración sólo se muestra la fragmentación de MSP-1, sin embargo, MSP-6 y MSP-7 también son procesados). Cuando el merozoíto invade el glóbulo rojo, una segunda catálisis mediada por SUB2 se produce, cortando el fragmento de 42 kDa de MSP-1 anclado a la membrana en piezas de 33 y 19 kDa respectivamente. Tomado de Holder (2009).

Ambos antígenos, AMA-1<sub>66</sub> y MSP-1<sub>19</sub>, son los mejores estudiados y caracterizados para su uso labores de control y serovigilancia de malaria por medio de la evaluación de los niveles de anticuerpos en las poblaciones de interés<sup>7</sup>. Sin embargo, en contextos de transmisión baja, inestable y altamente estacional, se requiere la utilización de múltiples antígenos dada la variabilidad (polimorfismos) en las secuencias proteicas del parásito con el fin de incrementar la sensibilidad en la detección de anticuerpos y obtener mediciones del grado de exposición a malaria más exactas<sup>50</sup>.

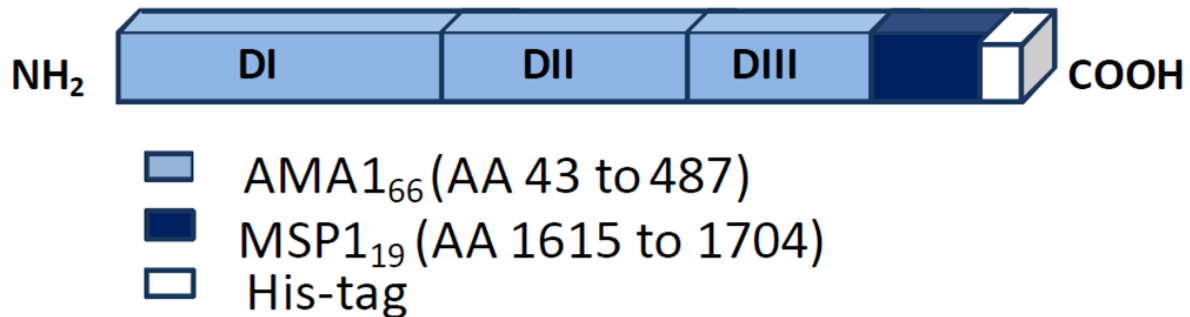
## **1.6 DESARROLLO Y OBJETIVO DE LAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS:**

La inexistencia de un método de cultivo in vitro eficaz para *P. vivax*, ha representado un obstáculo importante en el uso de antígenos específicos en la detección de anticuerpos antimalaria<sup>26</sup>, debido a que la obtención de antígenos totales o semipurificados es limitada. No obstante, el desarrollo de nuevas tecnologías en ingeniería genética ha permitido obtener proteínas recombinantes de *P. vivax* en cantidades suficientes para ser utilizadas en ensayos serológicos específicos<sup>8,27,28,80,81</sup>.

Dentro de estas tecnologías, la producción de proteínas de fusión (proteínas quiméricas, o simplemente, quimeras) abre una nueva puerta al mejoramiento de las herramientas basadas en el uso de antígenos recombinantes, como por ejemplo, el desarrollo de vacunas quiméricas que desencadenen respuestas humores y celulares mucho más intensas. Sobre este punto, estudios previos han mostrado que las proteínas quiméricas, producto de la fusión de los principales antígenos de *Plasmodium spp.*,



exhiben una mayor inmunogenicidad y antigenicidad que sus moléculas conformantes<sup>33-35,82,83</sup>. En el caso particular de la proteína quimérica AMA-1/MSP-1 viene siendo evaluada en modelos murinos como una potencial candidata a vacuna contra malaria por *P. falciparum*<sup>36,84</sup> y por *P. vivax*<sup>31</sup>, pero, no se han hallado reportes del uso de esta proteína de fusión para evaluar exposición a malaria en estudios seroepidemiológicos.

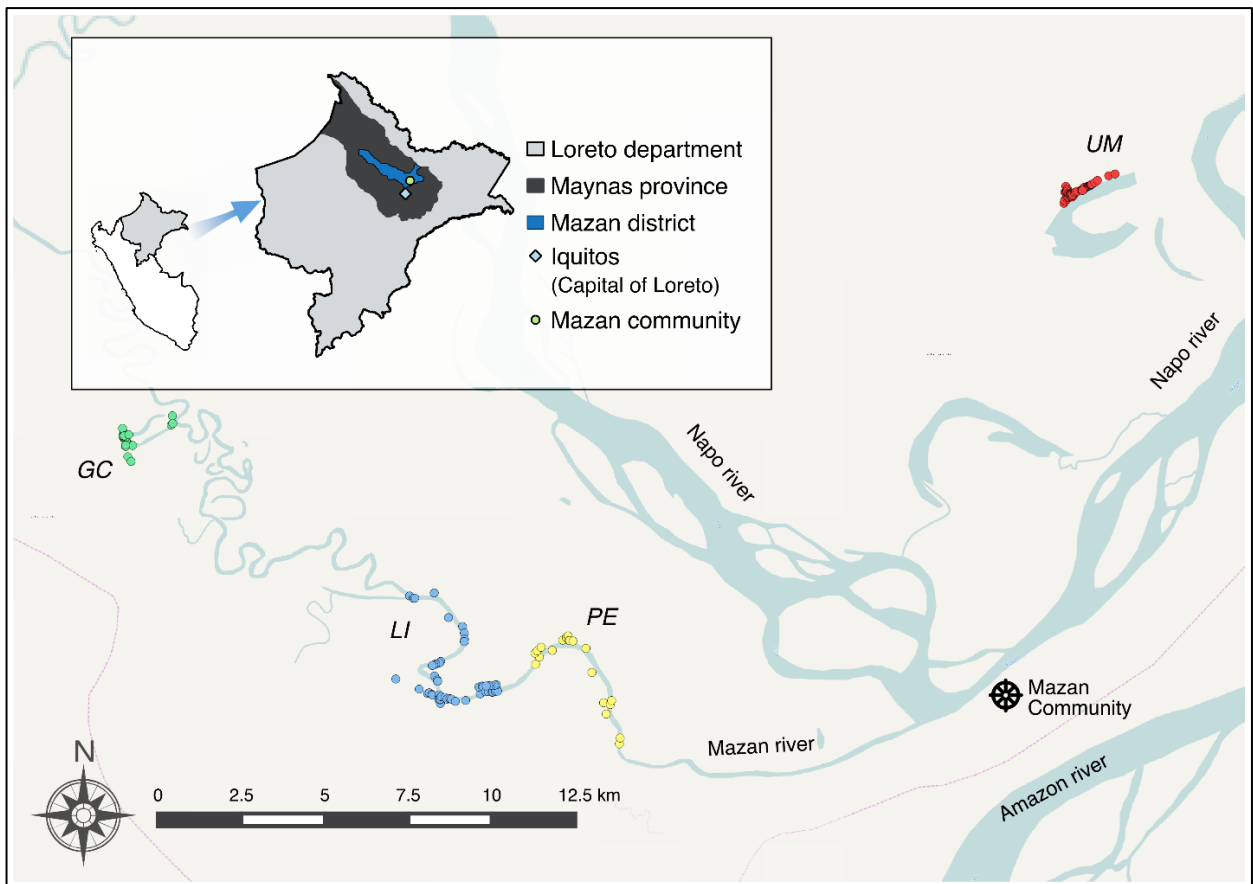


**Figura 10.** Representación esquemática de la proteína recombinante PvAMA-1<sub>66</sub>/MSP-1<sub>19</sub>. La proteína fue expresada fusionada a una etiqueta de poli-histidina en la región C-terminal. Los tres dominios de AMA-1<sub>66</sub> (DI, DII y DIII) y el fragmento inmunogénico de 19kDa de MSP-1 están representados. Tomado de Rocha *et al* (2013).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO Y ESTAMENTO ÉTICO:

Ochocientas veintitrés (n=823) muestras de sangre en papel filtro, obtenidas por punción digital, fueron colectadas de habitantes de cuatro comunidades del distrito de Mazán (Gamitana Cocha, Libertad, Primero de Enero y Urcomiraño) en el departamento amazónico de Loreto, una región endémica de malaria por *P. vivax*.



**Figura 11.** Mapa del distrito de Mazán, Departamento de Loreto. Gamitana Cocha (GC), Libertad (LI), Primero de Enero (PE) y Urcomiraño (UM). Tomado de Carrasco-Escobar *et al*, 2017.

Los participantes fueron enrolados como parte del estudio “*Estimación de la proporción de infecciones por malaria no detectadas por las intervenciones de detección activa de casos (DAC) en áreas endémicas de la Amazonía Peruana*” conducido entre Abril del 2015 y Marzo del 2016 por el Grupo de Investigación en Malaria del Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt”, proyecto el cual fue previamente aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (SIDISI: 0000064371). Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito para el uso de su sangre en esta investigación.

Los ensayos serológicos fueron realizados en las instalaciones del Laboratorio de Malaria, en el edificio de Laboratorios de Investigación y Desarrollo “Abraham Vaisberg Wollach” (LID) de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

## **2.2 PRODUCCIÓN DE ANTÍGENOS:**

Tres proteínas recombinantes fueron utilizadas como antígenos en los ensayos serológicos de esta investigación: i) el ectodominio del Antígeno Apical de Membrana 1 (PvAMA-1<sub>66</sub>, GenBank KJ010958), ii) el fragmento carboxilo terminal de 19 kDa de la Proteína de Superficie del Merozoíto 1 (PvMSP-1<sub>19</sub>, GenBank M60807.1) y iii) la proteína quimérica PvAMA-1/MSP-1<sub>19</sub> (de ahora en adelante denominada “quimera”),

producto de la fusión estructural de las dos anteriores. Estas proteínas fueron producidas, aisladas y purificadas según reportó Rocha *et al* (2017). Para nuestro fin, los antígenos fueron amablemente proporcionados por la Dra. Irene Soares del Departamento de Análisis Clínicos y Toxicológicos de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Sao Paulo, Brasil.

### **2.3 CONTROLES SEROLÓGICOS POSITIVOS Y NEGATIVOS:**

Un *pool* de sueros hiperreactivos de habitantes de áreas endémicas de malaria fue utilizado como control positivo en los ensayos serológicos. Los sueros combinados fueron diluidos en PBS-Blotto-Tween® 20 (receta en Anexo 1) y estandarizados para cada antígeno con el fin de alcanzar mediciones comparables (Densidades Ópticas entre los rangos de 2.0 a 2.5). Basados en este criterio, las diluciones fueron las siguientes: 1/1600 contra la quimera, 1/1000 contra PvMSP-1<sub>19</sub> y 1/250 contra PvAMA-1. Suero no reactivo fue colectado y combinado de ocho miembros del laboratorio de quienes se sabe nunca han sido expuestos a malaria (habitan en zonas no endémicas y no presentan un historial de viajes a zonas endémicas) y fue usado a una dilución de 1/400 en PBS-Blotto-Tween® 20 como control negativo en los análisis de laboratorio.

## **2.4 ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA) PARA LA DETECCIÓN DE INMUNOGLOBULINAS G ANTI-PLASMODIUM VIVAX:**

Placas de fondo plano de 96 pocillos (Costar, Corning Inc., NY, EE.UU) fueron incubadas a 4°C durante la noche con PvMSP-1<sub>19</sub>, PvAMA-1 y la quimera a 200 ng/100µL/pocillo usando tampón fosfato salino (PBS) a pH 7.4 (Sigma-Aldrich, EE.UU) como diluyente. Los siguientes pasos de este protocolo se llevaron a cabo a temperatura ambiente y las placas fueron lavadas tres veces con PBS-Tween® 20 (0.05%) luego de cada incubación.

Una vez recubierto el fondo de las placas con el antígeno respectivo, la solución fue removida y estas fueron saturadas durante una hora con 200µL/pocillo de PBS-Blotto (leche en polvo al 1% en PBS). Luego, 100µL/pocillo de la solución de elución de las muestras de sangre (cuadrados de papel filtro de 5mm<sup>2</sup> previamente eluidos durante la noche anterior en 1mL de PBS-Blotto-Tween, equivalente a una dilución de suero 1/400) fueron añadidos en duplicados e incubados por una hora. Para la detección de anticuerpos anti-*P. vivax* adquiridos de manera natural, se añadió 100µL/pocillo de un conjugado peroxidasa anti-IgG humana (Sigma-Aldrich, EE.UU) diluido 1/10000 en PBS-Tween. Luego de una hora de incubación, las placas fueron lavadas cinco veces y la reacción fue revelada añadiendo 100µL/pocillo de solución substrato ABTS (ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), Roche, Alemania), esta vez incubándose en oscuridad por una hora. Finalmente, la absorbancia de cada pocillo fue leída usando una longitud de onda de 415 nanómetros (Bio-Rad iMark™ Microplate

Absorbance Reader) y las Densidades Ópticas ( $DO_{415nm}$ ) obtenidas fueron corregidas mediante la sustracción del valor  $DO_{415nm}$  promedio de los pocillos “blancos” (tapizados con antígeno + solución de elución PBS-Blotto-Tween, ver Anexo 2) de cada placa.

Como una manera de estandarizar los valores  $DO_{415nm}$  registrados y disminuir la variación inter-placa, se calculó el porcentaje de positividad (PP) de cada muestra de la siguiente manera:

$$PP = \left( \frac{DO_{415nm} \text{ promedio de la muestra}}{DO_{415nm} \text{ promedio del control positivo de placa}} \right) \times 100$$

Un control de calidad ciego fue realizado en el 5% del total de muestras elegidas al azar para constatar los resultados previos.

## **2.5 DETERMINACIÓN DEL ESTADO SEROLÓGICO Y LOS NIVELES DE SEROPREVALENCIA EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO:**

Usando modelos mixtos se calcularon los puntos de corte para cada antígeno siguiendo los pasos previamente descritos por Corran *et al*<sup>28</sup>. De manera breve, los valores PP obtenidos fueron ajustados en dos distribuciones Gaussianas inherentes (subgrupo seropositivo y seronegativo) usando estimaciones de máxima verosimilitud (EMV), luego los puntos de corte fueron definidos como la media de la distribución seronegativa más tres desviaciones estándar (DE). Este conjunto de puntos de corte fue

usado para estimar la proporción de individuos positivos en la población para cada antígeno.

Para evaluar el potencial de la nueva proteína quimérica en estimar prevalencias similares que sus antígenos constituyentes, primero se calculó la proporción de seropositividad para cualquiera de los antígenos independientes (PvMSP-1<sub>19</sub> y/o PvAMA-1). Esta prevalencia fue luego comparada con las estimaciones obtenidas en base a la proteína quimérica utilizando puntos de corte a 2, 2.5 y 3 desviaciones estándar por encima de la media de la distribución seronegativa preestablecida con modelos mixtos.

## **2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO:**

Una matriz de datos fue generada en Excel 2013 (Microsoft Corp, EE.UU) y luego procesada en R 3.3.0 (R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Austria) para la conversión de los valores de DO<sub>415nm</sub> promedio a PP y el cálculo de los puntos de corte.

Para comparar los niveles de anticuerpos IgG detectados en las muestras (DO<sub>415nm</sub> corregida promedio) se utilizó el Análisis de Varianza (ANOVA) para medidas repetidas (MR) seguido de la prueba Post Hoc de Tukey para comparaciones múltiples. El coeficiente de Pearson fue utilizado para calcular el grado de correlación entre los valores DO<sub>415nm</sub> obtenidos con los diferentes antígenos, mientras que la prueba Chi-

cuadrado fue utilizada para analizar las diferencias entre proporciones de seropositividad.

Finalmente, usando el coeficiente Kappa de Cohen (Anexo 3), se analizó el nivel de concordancia para las estimaciones de seroprevalencia para cualquiera de los antígenos independientes (PvMSP-1<sub>19</sub> y/o PvAMA-1) versus la seroprevalencia obtenida usando la quimera. Los gráficos fueron diseñados en GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc, CA, EE.UU) y valores de “p” bajo 0.05 fueron considerados como significativos estadísticamente.

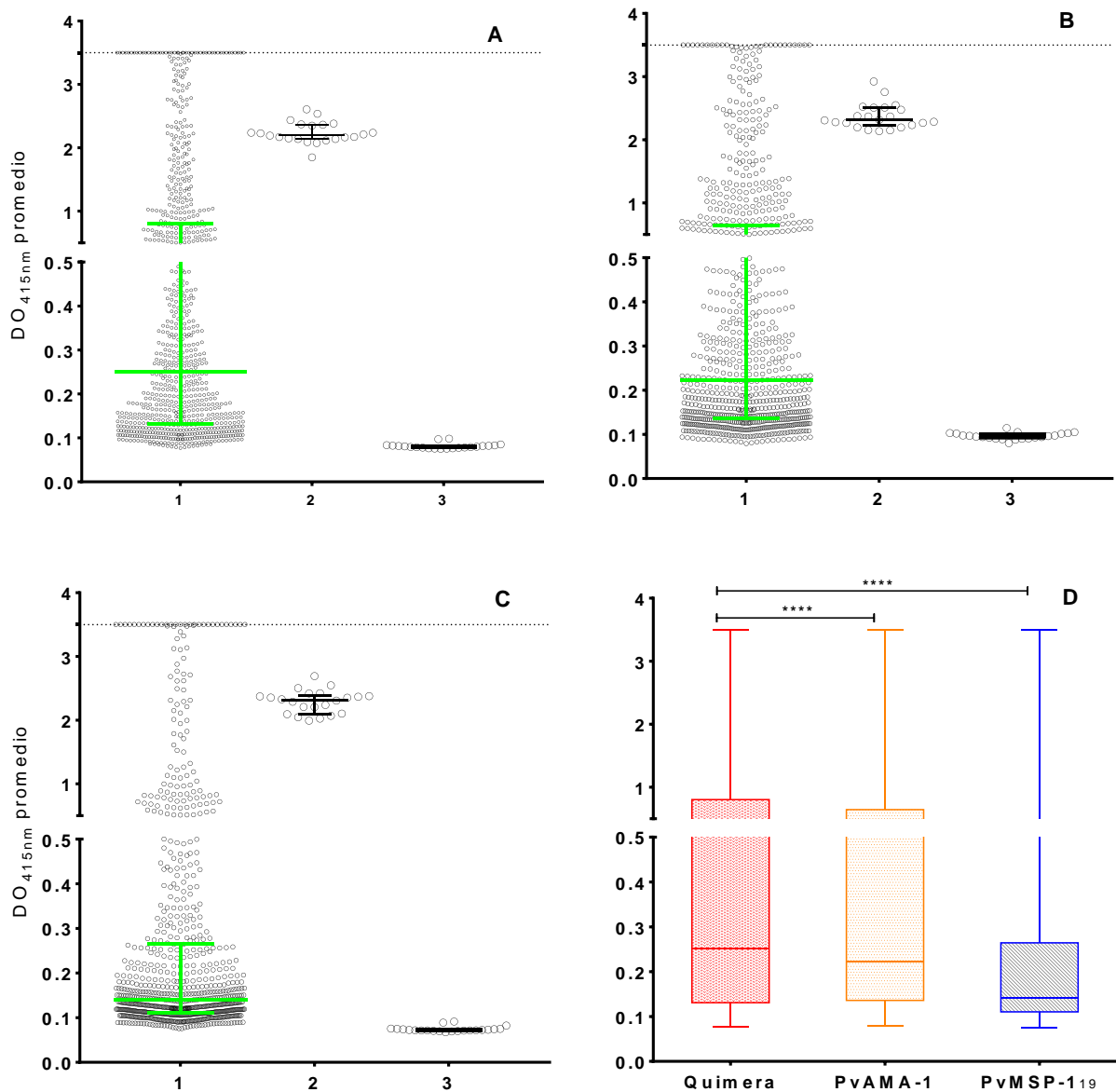


## RESULTADOS

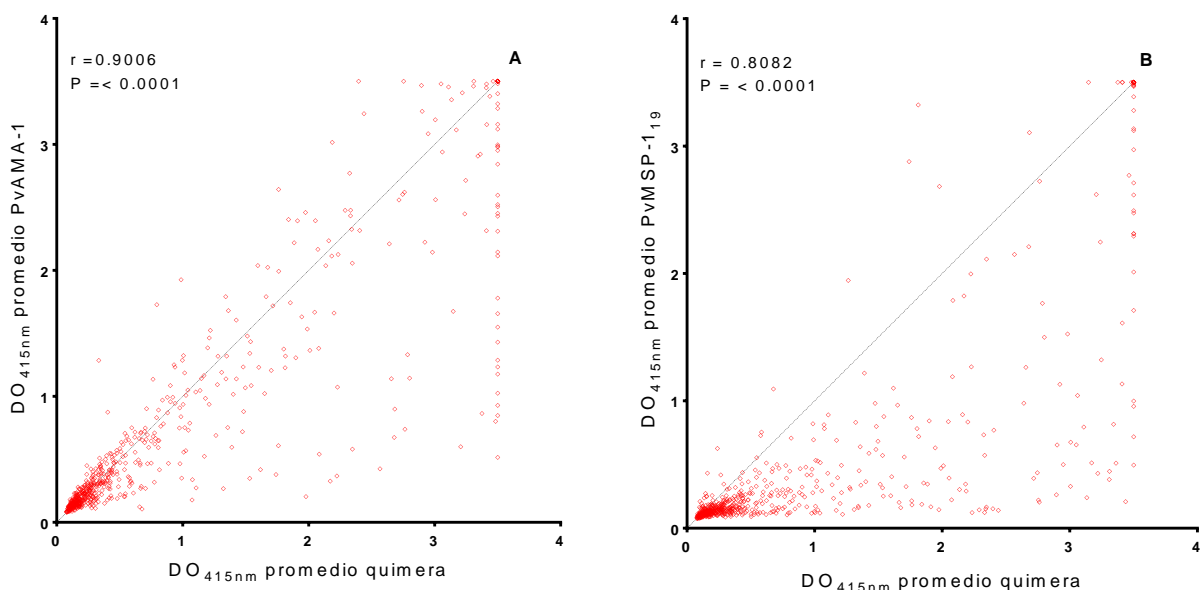
### 3.1 NIVELES DE ANTICUERPOS EN LA POBLACIÓN:

Los resultados de los 823 habitantes de Mazán (tabla descriptiva en Anexo 4), Loreto, junto con los *pools* de sueros positivos y negativos usados como controles experimentales fueron corregidos y representados en la Figura 12 (A, B y C). 46, 20 y 29 muestras reaccionaron de manera elevada contra la quimera, PvAMA-1 y PvMSP-1<sub>19</sub> respectivamente, excediendo el límite máximo de absorbancia ( $DO_{415nm} = 3.5$ ) de la lectora de placas (representado como una línea punteada horizontal en la Figura 12). Para resolver este inconveniente, se asumió el valor continuo de  $DO_{415nm}$  de 3.501 en dichas muestras para los cálculos posteriores.

Respecto a los niveles de anticuerpos detectados con los diferentes antígenos, reflejado en las absorbancias registradas, la proteína quimérica mostró una serorreactividad superior ( $p > 0.0001$ ) a las de PvAMA-1 y PvMSP-1<sub>19</sub>. Además, el análisis de correlación de los valores  $DO_{415nm}$  entre los antígenos mostró altos coeficientes al comparar la quimera versus ambos, PvAMA-1 ( $r = 0.9006$ ) y PvMSP-1<sub>19</sub> ( $r = 0.8082$ ) (Figura 13), lo que sugiere una importante conservación de epítopes durante la producción de PvAMA-1/MSP-1<sub>19</sub>.



**Figura 12. Niveles de anticuerpos específicos anti-*P. vivax* en habitantes del distrito de Mazán, Loreto.** Los puntos representan la absorbancia a 415nm obtenida por cada muestra al final del ensayo ELISA incluyendo los 823 habitantes de Mazán (1), los sueros positivos (2) y los sueros negativos (3) evaluados contra (A) la quimera, (B), PvAMA-1 y (C) PvMSP-1<sub>19</sub> (la distribución intercuartil se representa en verde). En D, se observa la comparación de los niveles de anticuerpos detectados por cada antígeno (\*\*\*\*= $p < 0.0001$ , comparaciones múltiples por la prueba Post Hoc de Tukey).



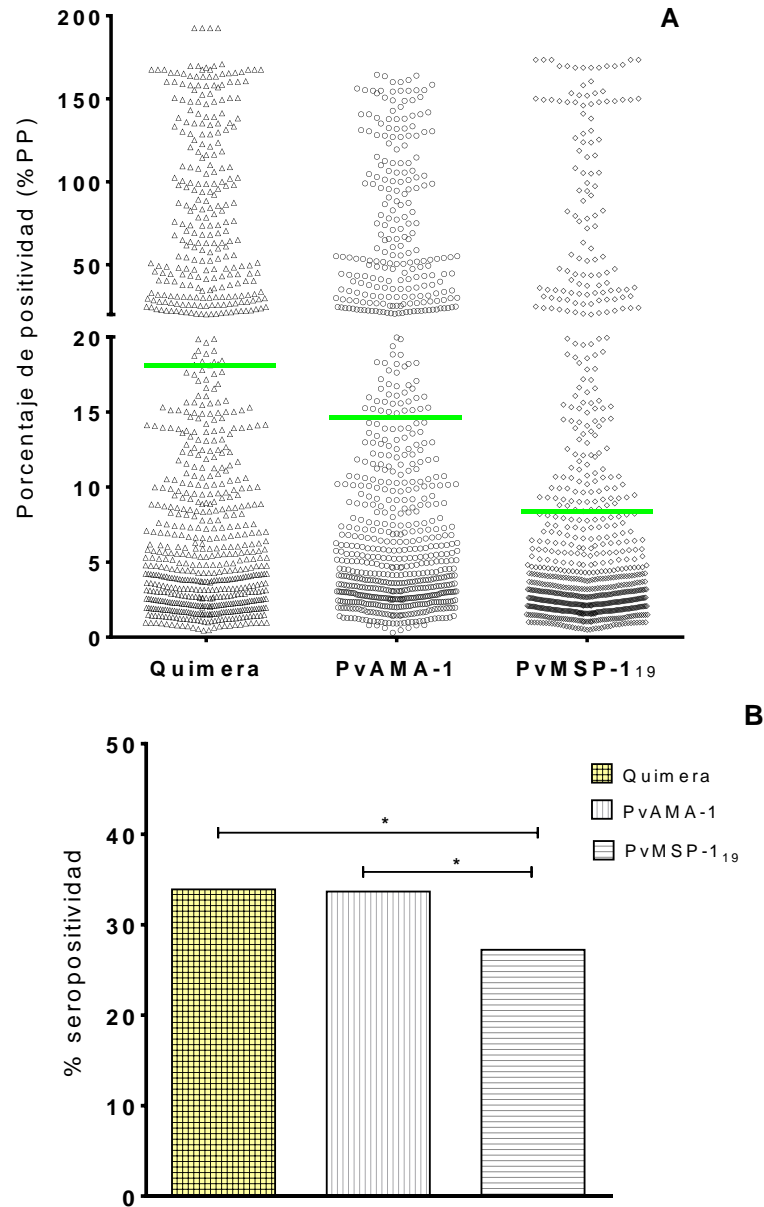
**Figura 13. Correlación de los valores OD<sub>415nm</sub> promedio obtenidos con los diferentes antígenos.** Quimera vs PvAMA-1 ( $r=0.9006$ ,  $p<0.0001$ ) (A), y quimera vs PvMSP-1<sub>19</sub> ( $r=0.8082$ ,  $p<0.0001$ ) (B). Una línea de equidad fue trazada como referencia.

### 3.2 PUNTOS DE CORTE Y PROPORCIÓN DE RESPUESTAS POSITIVAS PARA PvAMA-1, PvMSP-1<sub>19</sub> Y LA QUIMERA:

Luego de transformar los valores DO<sub>415nm</sub> obtenidos a porcentaje de positividad (PP), se calcularon los puntos de corte para cada antígeno como siguen: 17.98, 14.18, y 8.14 para la quimera, PvAMA-1 y PvMSP-1<sub>19</sub> respectivamente (Figura 14A).

Usando estos valores se estimaron las proporciones de individuos seropositivos entre la población en 33.9% (279/823) para la quimera, 33.7% (277/823) para PvAMA-1 y 27.2% (224/823) para PvMSP-1<sub>19</sub> (Anexo 5). Una mayor proporción de respuestas positivas fueron detectadas usando la quimera y PvAMA-1 comparadas con PvMSP-1<sub>19</sub> ( $p<0.05$ ), pero

ninguna diferencia significativa fue encontrada entre las estimaciones PvAMA-1 y la quimera (Figura 14B).



**Figura 14. Estimaciones de seroprevalencia con la quimera, PvAMA-1 y PvMSP-1<sub>19</sub>.** (A) Distribución de los valores PP para las 823 muestras (puntos de corte: 17.98%, 14.18%, y 8.14% para la quimera, PvAMA-1 y PvMSP-1<sub>19</sub> respectivamente representado como una línea verde horizontal); (B) la proporción de respuestas positivas detectadas con la quimera 33.9% (95%, CI=30.7-37.2%) y con PvAMA-1: 33.7% (95%, CI=30.5-37.0%) fueron significativamente superiores a aquellas estimadas con PvMSP-1<sub>19</sub>: 27.2% (95%, CI=24.3-30.4%). ( \* =  $p < 0.05$ ).

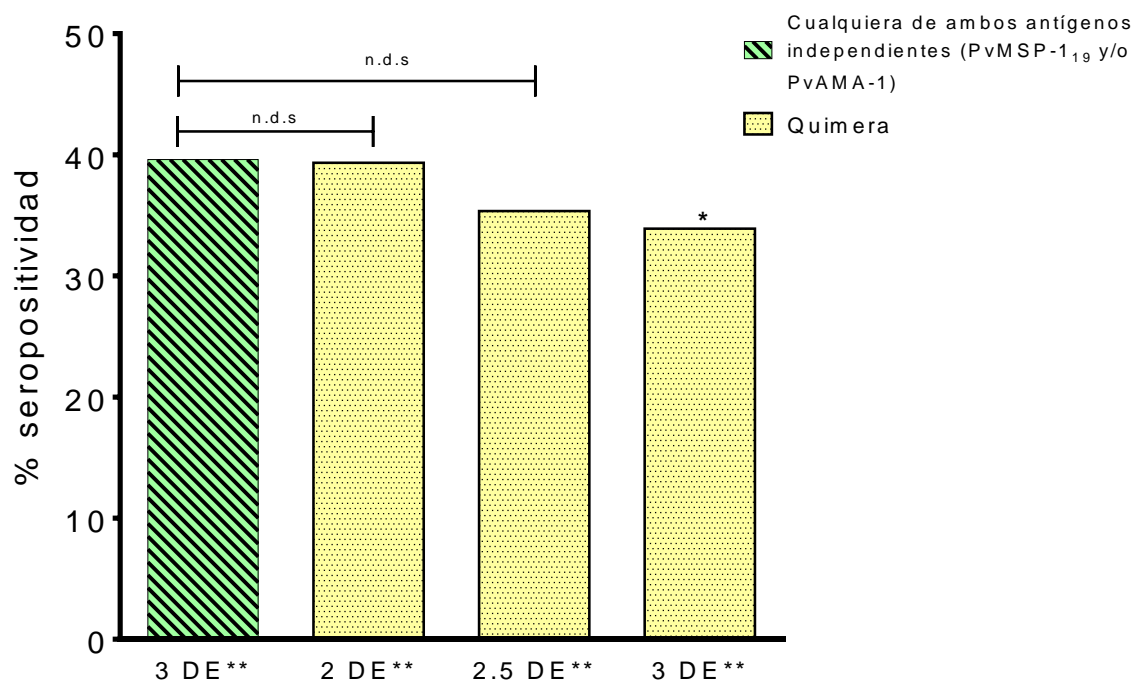
### **3.3 COMPARACIÓN DE LAS SEROPREVALENCIAS Y CONCORDANCIA EN EL ESTADO SEROLÓGICO OBTENIDAS CON PvAMA-1, PvMSP-1<sub>19</sub> Y LA QUIMERA:**

Un primer análisis de consenso entre la proporción de respuestas positivas y negativas obtenidas con los diferentes antígenos arrojó una concordancia casi perfecta entre los resultados individuales de la quimera y PvAMA-1 (valor de Kappa = 0.842), y una concordancia sustancial entre la quimera y PvMSP-1<sub>19</sub> (valor de Kappa = 0.724) (Anexo 6).

Posteriormente, se calculó la proporción de individuos seropositivos en la población para cualquiera de ambos antígenos independientes (PvMSP-1<sub>19</sub> y/o PvAMA-1) alcanzándose un 39.61% (n=326) de respuestas positivas, siendo significativamente mayor que la prevalencia encontrada únicamente con la proteína quimérica (33.9%, n=279) (Figura 15).

Cuando se analizó cuidadosamente los valores DO<sub>415nm</sub> registrados en las 49 muestras declaradas como seropositivas frente a cualquiera de los antígenos independientes (PvMSP-1<sub>19</sub> y/o PvAMA-1) pero seronegativas frente a la quimera (Tabla 8), se observó que la mayoría fueron reactivas contra esta última pero no lo suficiente para cruzar el punto de corte establecido a 3 desviaciones estándar sobre la media de la distribución seronegativa (Anexo 7). Se decidió entonces incluir en el análisis comparativo las estimaciones de prevalencia obtenidas con la proteína quimérica a 2 y 2.5 desviaciones estándar sobre esta media.

Como era de esperarse, las proporciones de individuos positivos detectados por la quimera se incrementaron a 39.49% (n=325) y 35.36% (n=291) a 2 y 2.5 desviaciones estándar respectivamente, además, ninguna diferencia significativa fue encontrada entre estas estimaciones y la proporción de respuestas positivas para cualquiera de ambos antígenos independientes (PvMSP-1<sub>19</sub> y/o PvAMA-1) (Figura 04).



**Figura 15. Seroprevalencia para la proteína quimérica y para cualquiera de ambos antígenos independientes (PvMSP-1<sub>19</sub> y/o PvAMA-1).** Proporción de respuestas positivas contra la quimera usando puntos de corte a 2 y 2.5 DE alcanzaron 39.49 (95%, CI=36.2-42.9%) y 35.36 (95%, CI=32.2-38.7%) respectivamente siendo estadísticamente similar a aquella obtenida contra cualquiera de ambos antígenos independientes (39.61%, 95% CI=36.3-34.0%). (\*p = 0.016, \*\* desviaciones estándar sobre la media de la distribución seronegativa calculada usando modelos mixtos, n.d.s = ninguna diferencia significativa).

Usando estas nuevas proporciones de positividad, se calcularon los coeficientes de concordancia basados en las coincidencias en los estados serológico (seropositivo/seronegativo) determinados con los tres antígenos. Interesantemente, un grado de concordancia casi perfecto fue encontrado en las estimaciones de prevalencia para cualquiera de ambos antígenos independientes (PvMSP-1<sub>19</sub> y/o PvAMA-1) y para la quimera a 2, 2.5 y 3 desviaciones estándar ( $K_1 = 0.886$ ,  $K_2 = 0.889$  and  $K_3 = 0.867$  respectivamente, Tabla 8).

| Seropositividad para cualquiera de ambos (PvAMA-1 y/o PvMSP-1 <sub>19</sub> ) | Seropositividad para la Quimera |     |                |     |               |     |
|---|---------------------------------|-----|----------------|-----|---------------|-----|
|   | 2 DE*                           |     | 2.5 DE*        |     | 3 DE*         |     |
|   | SI                              | NO  | SI             | NO  | SI            | NO  |
| SI  | 303                             | 23  | 287            | 39  | 277           | 49  |
| NO  | 22                              | 475 | 4              | 493 | 2             | 495 |
| Valor de Kappa (K)  | 0.886                           |     | 0.889          |     | 0.867         |     |
| 95% CI  | 0.853 – 0.918                   |     | 0.856 – 0.921  |     | 0.832 – 0.902 |     |
| Concordancia general  | 94.5%                           |     | 94.8%          |     | 93.8%         |     |
| Concordancia positiva   | 93.1%                           |     | 93.0%          |     | 91.6%         |     |
| Concordancia negativa   | 95.0%                           |     | 95.8%          |     | 95.1%         |     |
| Diferencia entre proporciones   | n.d.s (p>0.05)                  |     | n.d.s (p>0.05) |     | * p = 0.016   |     |

**Tabla 8.** Niveles de concordancia diagnóstica de los estados serológicos determinados con la quimera y con cualquiera de ambos antígenos independientes.

## DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó el desempeño de una nueva proteína quimérica, PvAMA-1/PvMSP-1<sub>19</sub>, para estimar la seroprevalencia de malaria por *P. vivax* en comunidades de la Amazonía peruana. Además, se propuso saber si esta proteína de fusión podía servir como un potencial reemplazo al uso independiente de sus antígenos constituyentes, PvAMA-1 y PvMSP-1<sub>19</sub>, para detectar anticuerpos antimalaria en estudios seroepidemiológicos. Para este fin, se desarrolló y estandarizó un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) indirecto basado en PvAMA-1/PvMSP-1<sub>19</sub> y luego se evaluó la reactividad de sueros de 823 individuos que habitan una zona endémica de malaria (Maynas, Loreto). Este estudio se constituye por ende, como el primer reporte del uso de esta proteína quimérica en un escenario real de investigación serológica.

Uno de los aspectos claves en el análisis de los valores DO<sub>415nm</sub> registrados fue elegir un método confiable para calcular los puntos de corte de los diferentes antígenos utilizados en esta investigación. La mayoría de los reportes previos consultados<sup>23,26,57,87</sup> sobre el uso de AMA-1 y MSP-1 para estimar la exposición a malaria han discriminado el estado serológico de la población utilizando un grupo adicional de individuos no expuestos. Dichas personas habitan usualmente un ambiente diferente y pueden tener un historial inmunológico diverso (exposición a otras infecciones no encontradas en áreas endémicas de malaria por *P. vivax*), siendo por tanto, no directamente comparable con la población de estudio.



En este enfoque, una muestra se declara positiva cuando sus niveles de anticuerpos antimalaria exceden la media más tres veces la desviación estándar de los valores registrados en los controles negativos (DSN: distribución seronegativa), no obstante, este método tiene la desventaja de subestimar los puntos de corte<sup>88</sup> ya que los individuos sanos de áreas endémicas tienen una mayor probabilidad de presentar respuestas serológicas cruzadas que gente viviendo fuera de la zona. Esto último es debido a la unión inespecífica de los antígenos recombinantes de malaria a anticuerpos producidos, por ejemplo, contra otras enfermedades infecciosas prevalentes en las zonas tropicales como el VIH<sup>89</sup>, HTLV-1<sup>90,91</sup>, esquistosomiasis<sup>92,93</sup>, leishmaniosis y toxoplasmosis<sup>94</sup>, entre otras, por ende los puntos de corte calculados con sueros de donantes sanos foráneos tienden a ser inferiores. En concordancia a esto, los sueros combinados no reactivos, utilizados como controles negativos en este estudio, alcanzaron valores de reactividad extremadamente bajos contra la quimera, PvAMA-1 y PvMSP-1<sub>19</sub> (Figura 12: A3, B3 y C3), haciéndose claro que los cálculos de los puntos de corte basados en el enfoque clásico nos llevarían a una sobreestimación general de las respuestas positivas en la población. Debido a esto, se optó por el uso de modelos mixtos para establecer los puntos de corte para los niveles de anticuerpos antimalaria como se ha reportado previamente<sup>6,8,28,88</sup>.

El análisis de las respuestas serológicas, reflejadas en los niveles de absorbancia registrados, evidenció una serorreactividad superior ( $p < 0.0001$ ) en las muestras cuando fueron evaluadas contra la proteína quimérica que frente a PvAMA-1 y PvMSP-1<sub>19</sub> en ensayos independientes (Figura 12, D). Esto concuerda con los resultados hallados por Pan *et al*<sup>84</sup> en *P. falciparum* y Rocha *et al*<sup>31</sup> en *P. vivax*, en donde se comprobó que la proteína de fusión AMA-1/MSP-1 tiene una mayor antigenicidad que sus antígenos conformantes, es capaz de

desencadenar respuestas humorales más potentes, y además, detecta niveles superiores de anticuerpos anti-AMA-1 y anti-MSP-1. Teóricamente, esto se debe a la suma de los efectos individuales de los antígenos conformantes en la detección de anticuerpos, efecto el cual es referido también en otras formulaciones de proteínas quiméricas antigénicas<sup>33-35,82,83</sup>. Posteriormente, esto fue comprobado con el cálculo de los coeficientes de correlación para los antígenos utilizados en esta investigación. El análisis de estos resultados mostró una fuerte correlación positiva al comparar la proteína quimérica versus ambos PvAMA-1 ( $r = 0.9006$ ,  $p < 0.0001$ ) y PvMSP-1<sub>19</sub> ( $r = 0.8082$ ,  $p < 0.0001$ ), sugiriendo una importante conservación de epítopes en esta quimera<sup>31</sup>.

Cuando se observaron las estimaciones de seroprevalencia (Figura 14), la proteína quimérica y PvAMA-1 fueron capaces de detectar proporciones de respuestas positivas significativamente superiores ( $P < 0.05$ ) que las de PvMSP-1<sub>19</sub>, sin embargo, no se encontraron diferencias entre los estimados de PvAMA-1 y la quimera, concordando por ende con la asunción general de que AMA-1 es un epítipo más inmunodominante que MSP-1 en individuos expuestos naturalmente a malaria<sup>16,17,19,22</sup>. Interesantemente, los resultados difieren a los obtenidos por Rocha *et al*<sup>31</sup> quién evaluó la quimera, PvAMA-1 y PvMSP-1<sub>19</sub> con sueros de 111 donantes del norte del Brasil con infecciones agudas de malaria por *P. vivax* y reportó una mayor seropositividad para PvMSP-1<sub>19</sub> en comparación a PvAMA-1. Esto puede ser atribuido a las diferencias entre los patrones de transmisión de malaria en la Amazonía peruana y brasilera<sup>3</sup> que podrían influir, por ejemplo, en el número de episodios de malaria previos entre los individuos de las poblaciones de estudio y, por ende, en los ratios de seroconversión para PvAMA-1 y PvMSP-1<sub>19</sub>. Otro posible factor estaría ligado a la estratificación por edades en los

individuos evaluados, ya que los niveles de anticuerpos específicos para malaria se incrementan con la edad<sup>49,51</sup>.

Finalmente, y como el objetivo fundamental de esta investigación, se evaluó el nivel de concordancia diagnóstica entre la proteína quimérica PvAMA-1/PvMSP-1<sub>19</sub>, y sus antígenos constituyentes en la discriminación del estado serológico (seropositivo o seronegativo). En áreas de baja e inestable transmisión de malaria, como la Amazonía Peruana<sup>4,47</sup>, es altamente recomendado utilizar más de un antígeno para evaluar el nivel de exposición al parásito a través de la medición de las respuestas serológicas<sup>30,95,96</sup>. Es así, que de manera tradicional, el laboratorio donde se ejecutó este proyecto ha estimado la prevalencia global de malaria por *P. vivax* calculando la proporción de respuestas positivas para cualquiera de ambos antígenos independientes (PvMSP-1<sub>19</sub> y/o PvAMA-1), como se ha reportado previamente en diversos estudios<sup>23-25</sup>. En esta investigación se encontró que la nueva proteína quimérica, usando un punto de corte a 3 DE sobre la DSN, fue capaz de estimar una proporción seropositiva cercana a aquella calculada en base a las respuestas frente a cualquiera de ambos antígenos independientes, no obstante, esta diferencia fue estadísticamente significativa (\*  $p = 0.016$ , Tabla 8). Se hipotetiza, que dado que los puntos de corte son una función de la desviación estándar de la subpoblación seronegativa<sup>88</sup>, un mayor grado de dispersión en los niveles de anticuerpos detectados resultaría en un punto de corte elevado. Esto concuerda con las observaciones y cálculos realizados en base a las respuestas serológicas frente a los tres antígenos (Anexo 5), en los que la proteína quimérica obtuvo la mayor desviación estándar (4.17), debido a su alta serorreactividad, y en consecuencia, alcanzó el punto de corte más alto (17.98, frente a 14.18 para PvAMA-1 y 8.14 para PvMSP-1<sub>19</sub>).

Lo anterior fue constatado cuando se analizó en detalle los niveles de reactividad de las 49 muestras declaradas como seropositivas para cualquiera de ambos antígenos independientes (PvMSP-1<sub>19</sub> y/o PvAMA-1) pero seronegativas por la quimera (Tabla 8), donde se observó que la mayoría de individuos fueron reactivos contra PvAMA-1/PvMSP-1<sub>19</sub> pero no lograron superar el punto de corte establecido a 3 DE (Anexo 7). En consecuencia, se optó por incluir en el análisis las proporciones calculadas a 2 y 2.5 DE, las cuales si fueron capaces de estimar seroprevalencias estadísticamente similares ( $p>0.05$ ). Además, los cálculos del coeficiente Kappa de Cohen sugieren una muy alta concordancia entre los estados serológicos definidos usando la proteína quimérica a tres diferentes puntos de corte (Tabla 8) y aquellos en base a las estimaciones de prevalencia para cualquiera de ambos antígenos independientes (PvMSP-1<sub>19</sub> y/o PvAMA-1).

Podrían resaltarse dos principales limitaciones en este trabajo de investigación. La primera está relacionada con el grado de reactividad cruzada entre los antígenos de *P. vivax* y *P. falciparum*<sup>30</sup>. En Loreto, una de cada cuatro infecciones por malaria es causada por *P.falciparum*<sup>2</sup>, lo cual sugiere la posibilidad de que algunos de los individuos de la población de estudio cuenten con exposición previa a esta especie, y por ende, anticuerpos específicos. Sin embargo, y a pesar de que AMA-1 y MSP-1<sub>19</sub> cuentan con secuencias conservadas entre especies, se reporta que la detección cruzada de anticuerpos es muy baja<sup>51</sup>. En segundo lugar, las asunciones estadísticas sobre las cuales los modelos mixtos generan dos distribuciones con las respuestas serológicas podrían no ajustarse a la realidad<sup>50</sup>, no obstante, es una de las metodologías que mejor se adecúa a las investigaciones de prevalencia y exposición a malaria dada la falta de controles negativos endémicos adecuados<sup>28,88,97</sup>.

En general, los resultados de este estudio sostienen la idea de que la quimera PvAMA-1/PvMSP-1<sub>19</sub> representa un potencial candidato para reemplazar el uso individual de PvMSP-1<sub>19</sub> y PvAMA-1 para detectar anticuerpos anti-*P. vivax* adquiridos de manera natural en habitantes de la Amazonía peruana. Adicionalmente, el uso de esta proteína de fusión reduciría significativamente el costo de ensayos ELISA permitiendo abaratar las pruebas serológicas y reducir el esfuerzo empleado por los operarios en las actividades de procesamiento de muestras, lo cual es particularmente importante en el contexto de investigaciones epidemiológicas cuando el análisis de sueros en escalas poblacionales es requerido.

## CONCLUSIONES

- La proteína quimérica PvAMA-1/PvMSP-1<sub>19</sub> mostró una serorreactividad superior frente al uso individual de PvAMA-1 y PvMSP-1<sub>19</sub>.
- Usando puntos de cortes a 2 y 2.5 desviaciones estándar sobre la media de la distribución seronegativa calculada por modelos mixtos, la proteína quimérica PvAMA-1/PvMSP-1<sub>19</sub> fue capaz de estimar proporciones de seropositividad similares a aquellas calculadas con ambos antígenos independientes (PvAMA-1 y/o PvMSP-1<sub>19</sub>).
- En general, los resultados de este estudio sugieren que la proteína quimérica PvAMA-1/PvMSP-1<sub>19</sub> puede utilizarse en remplazo de PvAMA-1 y PvMSP-1<sub>19</sub> para la detección de anticuerpos antimalaria en habitantes de la Amazonía peruana, con la ventaja de realizar solo un ensayo ELISA en lugar de dos, abaratando los costos de la prueba y reduciendo considerablemente el tiempo invertido en los análisis de laboratorio.

## RECOMENDACIONES

- La nueva proteína quimérica PvAMA-1/PvMSP-1<sub>19</sub> podría ser utilizada en ensayos múltiplex para evaluaciones serológicas de alto rendimiento “*high-throughput screening*”, ya que esta plataforma ofrece más ventajas que un tradicional ensayo ELISA indirecto en términos de volumen de muestra requerido, costos, eficiencia, sensibilidad, reproducibilidad, etc. Sin embargo, la inclusión de tecnologías múltiplex en Programas Nacionales de Control de Malaria requeriría una importante inversión para la adquisición de equipos, reactivos y entrenamiento de operarios siendo poco apropiado en un contexto de fondos económicos limitados. Adicionalmente, las experiencias previas con esta técnica en investigaciones de malaria por *P. vivax* son limitadas (en comparación aquellas en base a antígenos de *P. falciparum*) no habiéndose constituido hasta hoy como el *gold standard* para medir respuestas serológicas de habitantes de zonas endémicas.
- Es importante evaluar el verdadero impacto de la detección cruzada de anticuerpos entre *P. vivax* y *P. falciparum* en las pruebas serológicas basadas en AMA-1 y MSP-1<sub>19</sub>. El descubrimiento y desarrollo de nuevos antígenos recombinantes especie/estadio-específicos con menor grado de homologías en sus secuencias perfeccionaría las técnicas actuales de serodiagnóstico.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OMS. Informe Mundial Sobre el Paludismo. Génova, Suiza: Organización Mundial de la Salud, 2016.
2. Dirección General de Epidemiología, Ministerio de Salud Perú. Sala de Situación de Salud Perú: Semana epidemiológica No 02–2017. Lima, Perú: MINSA, 2017.
3. Recht J, Siqueira AM, Monteiro WM, Herrera SM, Herrera S, Lacerda MVG. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: current challenges in malaria control and elimination. *Malar J.* 2017 Jul 4;16(1):273.
4. Rosas-Aguirre A, Gamboa D, Manrique P, Conn J, Moreno M, Lescano A et al. Epidemiology of Plasmodium vivax Malaria in Peru. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 2016; 95(6 Suppl):133-144.
5. Bousema T, Youssef RM, Cook J, et al. Serologic markers for detecting malaria in areas of low endemicity, Somalia, 2008. *Emerging Infect Dis.* 2010;16(3):392-9.
6. Cook J, Reid H, Iavro J, et al. Using serological measures to monitor changes in malaria transmission in Vanuatu. *Malaria Journal.* 2010;9:169.
7. Tusting L, Bousema T, Smith D. Measuring Changes in Plasmodium falciparum Transmission: Precision, Accuracy and Costs of Metrics. En: Rollinson D, editor. *Advances in Parasitology.* Oxford: Elsevier; 2014. (82): 151-208.
8. Corran P, Coleman P, Riley E, Drakeley C: Serology: a robust indicator of malaria transmission intensity? *Trends Parasitol* 2007, 23:575-582.
9. Mwanziva C, Shekalaghe S, Ndaro A, Mengerink B, Megiroo S, Mosha F, et al. Overuse of artemisinin-combination therapy in Mtowa Mbu (river of mosquitoes), an area misinterpreted as high endemic for malaria. *Malar J.* 2008;7:232.



10. Herrera S, Corradin G, Arevalo-Herrera M. An update on the search for a *Plasmodium vivax* vaccine. *Trends Parasitology* 2007;23(3):122–8.
11. Blackman MJ, Heidrich HG, Donachie S, McBride JS, Holder AA. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. *J Exp Med.* 1990;172(1):379-82.
12. Mahanty S, Saul A, Miller LH. Progress in the development of recombinant and synthetic blood-stage malaria vaccines. *J Exp Biol* 2003;206(21):3781–8.
13. Good MF. Vaccine-induced immunity to malaria parasites and the need for novel strategies. *Trends Parasitol* 2005;21(1):29–34.
14. Vekemans J, Ballou WR. *Plasmodium falciparum* malaria vaccines in development. *Expert Rev Vaccines* 2008;7(2):223–40.
15. Crewther PE, Matthew ML, Flegg RH, Anders RF. Protective immune responses to apical membrane antigen 1 of *Plasmodium chabaudi* involve recognition of strain-specific epitopes. *Infect Immun.* 1996;64(8):3310-7.
16. Kocken CH, Dubbeld MA, Van der wel A, et al. High-level expression of *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (AMA-1) in *Pichia pastoris*: strong immunogenicity in *Macaca mulatta* immunized with *P. vivax* AMA-1 and adjuvant SBAS2. *Infect Immun.* 1999;67(1):43-9.
17. Remarque EJ, Faber BW, Kocken CH, Thomas AW. Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review. *Trends Parasitol* 2008;24(2):74–84.
18. Yandar N, Pastorin G, Prato M, Bianco A, Patarroyo ME, Lozano JM. Immunological profile of a *Plasmodium vivax* AMA-1 N-terminus peptide-carbon nanotube conjugate in an infected *Plasmodium berghei* mouse model. *Vaccine.* 2008;26(46):5864-73.
19. Holder AA, Freeman RR. Immunization against blood-stage rodent malaria using purified parasite antigens. *Nature.* 1981;294(5839):361-4.

20. Sinnis P, Sim BK. Cell invasion by the vertebrate stages of *Plasmodium*. *Trends Microbiol.* 1997;5(2):52-8.
21. Lim CS, Kim SH, Kwon SI, Song JW, Song KJ, Lee KN. Analysis of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 gene sequences from resurgent Korean isolates. *Am J Trop Med Hyg.* 2000;62(2):261-5.
22. Dutta S, Kaushal DC, Ware LA, et al. Merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* induces a protective response against *Plasmodium cynomolgi* challenge in rhesus monkeys. *Infect Immun.* 2005;73(9):5936-44.
23. Riccio E, Totino P, Pratt-Riccio L, Ennes-Vidal V, Soares I, Rodrigues M et al. Cellular and humoral immune responses against the *Plasmodium vivax* MSP-1<sub>19</sub> malaria vaccine candidate in individuals living in an endemic area in north-eastern Amazon region of Brazil. *Malar J.* 2013;12(1):326.
24. Bueno L, Lobo F, Morais C, Mourão L, de Ávila R, Soares I et al. Identification of a Highly Antigenic Linear B Cell Epitope within *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1 (AMA-1). *PLoS ONE.* 2011;6(6):e21289.
25. Cunha MG, Rodrigues MM, Soares IS. Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP119 expressed in distinct bacterial vectors. *Vaccine.* 2001;20: 385–396.
26. Rodrigues MH, Cunha MG, Machado RL, Ferreira OC, Rodrigues MM, Soares IS. Serological detection of *Plasmodium vivax* malaria using recombinant proteins corresponding to the 19-kDa C-terminal region of the merozoite surface protein-1. *Malar J.* 2003;2(1):39.
27. Drakeley CJ, Corran PH, Coleman PG, Tongren JE, McDonald SL, Carneiro I, et al. Estimating medium- and long-term trends in malaria transmission by using serological markers of malaria exposure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:5108–13.

28. Corran PH, Cook J, Lynch C, Leendertse H, Manjurano A, Griffin J, et al. Dried blood spots as a source of anti-malarial antibodies for epidemiological studies. *Malar J*. 2008;7:195.
29. Cunha MG, Silva ES, Sepúlveda N, et al. Serologically defined variations in malaria endemicity in Pará state, Brazil. *PLoS ONE*. 2014;9(11).
30. Elliott S, Fowkes F, Richards J, Reiling L, Drew D, Beeson J. Research priorities for the development and implementation of serological tools for malaria surveillance. *F1000Prime Reports*. 2014;6.
31. Rocha M, Franoso K, Lima L, Camargo T, Machado R, Costa F et al. Generation, characterization and immunogenicity of a novel chimeric recombinant protein based on *Plasmodium vivax* AMA-1 and MSP1 19. *Vaccine*. 2017;35(18):2463-2472.
32. Faber B.W., Remarque E.J., Morgan W.D., Kocken C.H.M., Holder A.A., Thomas A.W. Malaria vaccine-related benefits of a single protein comprising *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 domains I and II fused to a modified form of the 19-kilodalton C-terminal fragment of merozoite surface protein 1, *Infect Immun* 75 (2007) 5947–5955.
33. Shi Q, Lynch MM, Romero M, Burns JM. Enhanced protection against malaria by a chimeric merozoite surface protein vaccine. *Infect Immun*. 2007;75(3):1349-58.
34. Tamborrini M, Stoffel SA, Westerfeld N, et al. Immunogenicity of a virosomally-formulated *Plasmodium falciparum* GLURP-MSP3 chimeric protein-based malaria vaccine candidate in comparison to adjuvanted formulations. *Malar J*. 2011;10:359.
35. Burns JM, Miura K, Sullivan J, Long CA, Barnwell JW. Immunogenicity of a chimeric *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein vaccine in Aotus monkeys. *Malar J*. 2016;15:159.

36. Hu J, Chen Z, Gu J, et al. Safety and immunogenicity of a malaria vaccine, Plasmodium falciparum AMA-1/MSP-1 chimeric protein formulated in montanide ISA 720 in healthy adults. PLoS ONE. 2008;3(4):e1952.
37. Basu S, Sahi P. Malaria: An Update. The Indian Journal of Pediatrics. 2017;84(7):521-528.
38. Pearson R. Paludismo [Internet]. Manuales Merck. 2017 [citado 12 Julio 2017]. Disponible en: <http://www.merckmanuals.com/es-ca/professional/enfermedades-infecciosas/protozoos-extraintestinales/paludismo>
39. White NJ, Breman JG. Malaria. In: Kasper DL, Fauci AS, Longo DL, Braunwald E, Hauser SL, Jameson JL, editors. Harrison's principles of internal medicine, vol. 1. 7th ed. USA: McGraw-Hill; 2008. p. 1280–93.
40. Mathison B, Pritt B. Update on Malaria Diagnostics and Test Utilization. Journal of Clinical Microbiology. 2017;55(7):2009-2017.
41. OMS. Directrices para el tratamiento de la malaria. Génova, Suiza: Organización Mundial de la Salud, 2013.
42. Griffing SM, Gamboa D, Udhayakumar V. The history of 20th century malaria control in Peru. Malar J. 2013;12:303.
43. Legua, P. Malaria en el Perú. Revista Médica Hederiana. 1994;5(3).
44. Soto-Calle V, Rosas-Aguirre A, Llanos-Cuentas A, Abatih E, DeDeken R, Rodriguez H et al. Spatio-temporal analysis of malaria incidence in the Peruvian Amazon Region between 2002 and 2013. Scientific Reports. 2017;7:40350.
45. da Silva-Nunes M, Moreno M, Conn JE, Gamboa D, Abeles S, Vinetz JM, Ferreira MU. Amazonian malaria: asymptomatic human reservoirs, diagnostic challenges, environmentally-driven changes in mosquito vector populations, and the mandate for sustainable control strategies. Acta Trop 2012. 121: 281–291.

46. Ferreira MU, de Oliveira TC. Challenges for *Plasmodium vivax* malaria elimination in the genomics era. *Pathog Glob Health* 2015. 109: 89–90.
47. Roshanravan B, Kari E, Gilman RH, Cabrera L, Lee E, Metcalfe J, Calderon M, Lescano AG, Montenegro SH, Calampa C, Vinetz JM. Endemic malaria in the Peruvian Amazon Region of Iquitos. *Am J Trop Med Hyg* 2003. 69: 45–52.
48. OMS. Informe Mundial Sobre el Paludismo. Génova, Suiza: Organización Mundial de la Salud, 2015.
49. Folegatti P, Siqueira A, Monteiro W, Lacerda M, Drakeley C, Braga É. A systematic review on malaria sero-epidemiology studies in the Brazilian Amazon: insights into immunological markers for exposure and protection. *Malaria Journal*. 2017;16(1).
50. Rosas-Aguirre, A. Understanding malaria transmission dynamics for malaria control and elimination in Peru. Tesis doctoral. Université Catholique de Louvain; 2015.
51. Dewasurendra R, Dias J, Sepulveda N, Gunawardena G, Chandrasekharan N, Drakeley C et al. Effectiveness of a serological tool to predict malaria transmission intensity in an elimination setting. *BMC Infectious Diseases*. 2017;17(1).
52. Perlmann P, Troye-Blomberg M. Malaria and the Immune System in Humans. En: Perlmann P, Troye-Blomberg M, editores. *Malaria Immunology*. Basel: Karger; 2002. (80):229-242.
53. Wright G, Rayner J. *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Invasion: Combining Function with Immune Evasion. *PLoS Pathogens*. 2014;10(3):e1003943.
54. Badu K, Gyan B, Appawu M, Mensah D, Dodoo D, Yan G et al. Serological evidence of vector and parasite exposure in Southern Ghana: the dynamics of malaria transmission intensity. *Parasites & Vectors*. 2015;8(1).

55. O'Kennedy R, Fitzgerald S, Murphy C. Don't blame it all on antibodies – The need for exhaustive characterisation, appropriate handling, and addressing the issues that affect specificity. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2017;89:53-59.
56. Bueno LL, Morais CG, Soares IS, et al. Plasmodium vivax recombinant vaccine candidate AMA-1 plays an important role in adaptive immune response eliciting differentiation of dendritic cells. *Vaccine*. 2009;27(41):5581-8.
57. Rodrigues MH, Rodrigues KM, Oliveira TR, Cômodo AN, Rodrigues MM, Kocken CH, Thomas AW, Soares IS. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant Plasmodium vivax apical membrane antigen-1. *Int J Parasitol* 2005; 35: 185-192.
58. Gunasekera AM, Wickramarachchi T, Neafsey DE, et al. Genetic diversity and selection at the Plasmodium vivax apical membrane antigen-1 (PvAMA-1) locus in a Sri Lankan population. *Mol Biol Evol*. 2007;24(4):939-47.
59. Rajesh V, Elamaram M, Vidya S, Gowrishankar M, Kochar D, Das A. Plasmodium vivax: genetic diversity of the apical membrane antigen-1 (AMA-1) in isolates from India. *Exp Parasitol*. 2007;116(3):252-6.
60. Haghi AM, Khoramizade MR, Nateghpour M, et al. A recombinant Plasmodium vivax apical membrane antigen-1 to detect human infection in Iran. *Korean J Parasitol*. 2012;50(1):15-21.
61. Hehl AB, Lekutis C, Grigg ME, et al. Toxoplasma gondii homologue of plasmodium apical membrane antigen 1 is involved in invasion of host cells. *Infect Immun*. 2000;68(12):7078-86.
62. Triglia T, Healer J, Caruana SR, et al. Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by Plasmodium species. *Mol Microbiol*. 2000;38(4):706-18.

63. Li F, Dluzewski A, Coley AM, et al. Phage-displayed peptides bind to the malarial protein apical membrane antigen-1 and inhibit the merozoite invasion of host erythrocytes. *J Biol Chem*. 2002;277(52):50303-10.
64. Mitchell GH, Thomas AW, Margos G, Dluzewski AR, Bannister LH. Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. *Infect Immun*. 2004;72(1):154-8.
65. Fraser TS, Kappe SH, Narum DL, Vanbuskirk KM, Adams JH. Erythrocyte-binding activity of *Plasmodium yoelii* apical membrane antigen-1 expressed on the surface of transfected COS-7 cells. *Mol Biochem Parasitol*. 2001;117(1):49-59.
66. Kato K, Mayer DC, Singh S, Reid M, Miller LH. Domain III of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 binds to the erythrocyte membrane protein Kx. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(15):5552-7.
67. MacRaild C, Anders R, Foley M, Norton R. Apical Membrane Antigen 1 as an Anti-Malarial Drug Target. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2011;11(16):2039-2047.
68. Del Portillo HA, Longacre S, Khouri E, David PH. Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals a sequence conserved between different *Plasmodium* species. *Proc Natl Aca Sci USA* 1991;88: 4030–4152.
69. Gibson HL, Tucker JE, Kaslow DC, et al. Structure and expression of the gene for Pv200, a major blood-stage surface antigen of *Plasmodium vivax*. *Mol Biochem Parasitol*. 1992;50(2):325-33.
70. Kolakovich KA, Ssengoba A, Wojcik K, et al. *Plasmodium vivax*: favored gene frequencies of the merozoite surface protein-1 and the multiplicity of infection in a malaria endemic region. *Exp Parasitol*. 1996;83(1):11-9.
71. Cruz-Gallardo I, Diaz-Moreno I, Diaz-Quintana A, Donaire A, Velazquez-Campoy A, Curd RD, Rangachari K, Birdsall B, Ramos A, Holder AA, De la Rosa MA:

Antimalarial activity of cupredoxins: the interaction of Plasmodium merozoite surface protein 119 (MSP-119) and Rusticyanin. *J Biol Chem* 2013, 288:20896–20907.

72. Paul AS, Egan ES, Duraisingh MT. Host-parasite interactions that guide red blood cell invasion by malaria parasites. *Curr Opin Hematol*. 2015;22(3):220-6.
73. Holder AA, Blackman MJ, Burghaus PA, Chappel JA, Ling IT, McCallum-Deighton N, Shai S: A malaria merozoite surface protein (MSP1)-structure, processing and function. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992, 87:37–42.
74. Gerold P, Schofield L, Blackman MJ, Holder AA, Schwarz RT: Structural analysis of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of the merozoite surface proteins-1 and -2 of Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol* 1996, 75:131–143.
75. Ladeia-Andrade S, Ferreira M, Scopel K, Braga É, Bastos M, Wunderlich G et al. Naturally acquired antibodies to merozoite surface protein (MSP)-1(19) and cumulative exposure to Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax in remote populations of the Amazon Basin of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102(8):943-951.
76. Soares IS, Levitus G, Souza JM, Del portillo HA, Rodrigues MM. Acquired immune responses to the N- and C-terminal regions of Plasmodium vivax merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria. *Infect Immun*. 1997;65(5):1606-14.
77. Soares IS, Oliveira SG, Souza JM, Rodrigues MM. Antibody response to the N and C-terminal regions of the Plasmodium vivax Merozoite Surface Protein 1 in individuals living in an area of exclusive transmission of P. vivax malaria in the north of Brazil. *Acta Trop*. 1999;72(1):13-24.
78. Soares IS, Da cunha MG, Silva MN, Souza JM, Del portillo HA, Rodrigues MM. Longevity of naturally acquired antibody responses to the N- and C-terminal regions of Plasmodium vivax merozoite surface protein 1. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;60(3):357-63.



79. Holder A. The carboxy-terminus of merozoite surface protein 1: structure, specific antibodies and immunity to malaria. *Parasitology*. 2009;136(12):1445.
80. Stewart L, Gosling R, Griffin J, Gesase S, Campo J, Hashim R, Masika P, Mosha J, Bousema T, Shekalaghe S, Cook J, Corran P, Ghani A, Riley EM, Drakeley C: Rapid assessment of malaria transmission using agespecific sero-conversion rates. *PLoS One* 2009, 4:e6083.
81. Williams GS, Mweya C, Stewart L, Mtove G, Reyburn H, Cook J, Corran PH, Riley EM, Drakeley CJ: Immunophoretic rapid diagnostic tests as a source of immunoglobulins for estimating malaria sero-prevalence and transmission intensity. *Malar J* 2009, 8:168.
82. Roeffen W, Theisen M, Van de vegte-bolmer M, et al. Transmission-blocking activity of antibodies to *Plasmodium falciparum* GLURP.10C chimeric protein formulated in different adjuvants. *Malar J*. 2015;14:443.
83. Draper SJ, Angov E, Horii T, et al. Recent advances in recombinant protein-based malaria vaccines. *Vaccine*. 2015;33(52):7433-43.
84. Pan W, Huang D, Zhang Q, Qu L, Zhang D, Zhang X et al. Fusion of Two Malaria Vaccine Candidate Antigens Enhances Product Yield, Immunogenicity, and Antibody-Mediated Inhibition of Parasite Growth In Vitro. *The Journal of Immunology*. 2004;172(10):6167-6174.
85. Rocha M, Ostermayer P, Sanches K, Ersching j, Martins M, Russell B, Rénia L, Soares I. Immunogenicity of a novel chimeric recombinant protein for the development of a vaccine against *Plasmodium vivax* malaria. En: Poster: Keystone Symposia meeting on Advancing Vaccines in the Genomics Era. Rio de Janeiro, Brasil. Octubre 2013.
86. Carrasco-Escobar G, Gamboa D, Castro M, Bangdiwala S, Rodriguez H, Contreras-Mancilla J, Alava F, Speybroeck N, Lescano A, Vinetz J, Rosas-Aguirre A, Llanos-Cuentas A. Micro-epidemiology and spatial heterogeneity of *P. vivax* parasitaemia in

riverine communities of the Peruvian Amazon: A multilevel analysis. *Scientific Reports* 2017; 7:8082.

87. Salavatifar M, Zakeri S, Abouie Mehrizi A, Mirkhazemi S, Dinparast Djadid N. Evaluation of Naturally Acquired Antibody Responses to Two Variant Forms of *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen-1 in Individuals Living in Areas of Low and Unstable Malaria Transmission of Iran. *Arch Iran Med.* 2015; 18(12): 834 – 843.
88. Sepulveda N, Stresman G, White M, Drakeley C. Current Mathematical Models for Analyzing Anti-Malarial Antibody Data with an Eye to Malaria Elimination and Eradication. *J Immunol Res* 2015; 15:21.
89. Volsky, D.J., et al., Antibodies to HTLV-III/LAV in Venezuelan patients with acute malarial infections. *N Engl J Med*, 1986. 314(10): 647-8.
90. Porter, K.R., et al., Evidence for anti-*Plasmodium falciparum* antibodies that cross-react with human T-lymphotropic virus type I proteins in a population in Irian Jaya, Indonesia. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1994. 1(1): p. 11-5.
91. Elm, J., R. Desowitz, and A. Diwan, Serological cross-reactivities between the retroviruses HIV and HTLV-1 and the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *P N G Med J*, 1998. 41(1): p. 15-22.
92. Naus, C.W., et al., Serological responses among individuals in areas where both schistosomiasis and malaria are endemic: cross-reactivity between *Schistosoma mansoni* and *Plasmodium falciparum*. *J Infect Dis*, 2003. 187(8): p. 1272-82.
93. Pierrot, C., et al., Identification of a novel antigen of *Schistosoma mansoni* shared with *Plasmodium falciparum* and evaluation of different cross-reactive antibody subclasses induced by human schistosomiasis and malaria. *Infect Immun*, 2006. 74(6): p. 3347-54.
94. Abramo C., Fontes C.J., Krettli A.U. Cross-reactivity between antibodies in the sera of individuals with leishmaniasis, toxoplasmosis, and Chagas' disease and antigens of the

blood-stage forms of *Plasmodium falciparum* determined by indirect immunofluorescence. *Am J Trop Med Hyg*. 1995. 53(2):202-5.

95. Rosas-Aguirre A, Llanos-Cuentas A, Speybroeck N, Cook J, Contreras-Mancilla J, Soto V et al. Assessing malaria transmission in a low endemicity area of north-western Peru. *Malaria Journal*. 2013;12(1):339.
96. Rosas-Aguirre A, Ponce O, Carrasco-Escobar G, Speybroeck N, Contreras-Mancilla J, Gamboa D et al. *Plasmodium vivax* malaria at households: spatial clustering and risk factors in a low endemicity urban area of the northwestern Peruvian coast. *Malaria Journal*. 2015;14(1).
97. Hui SL, Zhou XH. Evaluation of diagnostic tests without gold standards. *Stat Methods Med Res*. 1998;7: 354–370.
98. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977; 33:159-174.

## ANEXOS

**ANEXO 1:** Recetas para la preparación de las soluciones utilizadas en el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) indirecto.

**a) Tampón fosfato salino: PBS 7.4 pH 1X:**

1. Diluir un sobre de PBS (NaCl 0.138 M; KCl - 0.0027 M, Sigma-Aldrich, EE.UU) en 1 litro de agua destilada o desionizada.
2. Constatar, y corregir de ser necesario, el pH de la solución a 7.4 usando un pHmetro.
3. Conservar a 4°C.

**b) Solución de bloqueo: PBS-Blotto (1%):**

1. Diluir 10 gramos de leche en polvo (Anchor) en 1 litro de PBS 7.4 pH 1X.
2. Adicionar 3.5 gramos de cloruro de sodio a la solución anterior.
3. Conservar a 4°C.

**c) Solución de dilución de antígenos y lavado: PBS-Tween® 20 (0.05%):**

1. Adicionar 500 µL de Tween® 20 (Merck & Co, US) en 1 litro de PBS 7.4 pH 1X.
2. Conservar a 4°C.

**d) Solución de elución de muestras: PBS-Blotto-Tween® 20:**

1. Diluir 10 gramos de leche en polvo (Anchor) en 1 litro de PBS 7.4 pH 1X.
2. Adicionar 3.5 gramos de cloruro de sodio a la solución anterior.
3. Adicionar 500 µL de Tween® 20 (Merck & Co, US) en 1 litro de PBS 7.4 pH 1X.
4. Conservar a 4°C.

**ANEXO 2:** Diseño de placa utilizado en el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) indirecto.

|   | 1  | 2  | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  | 11  | 12  |
|---|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| A | CP | CP | M7  | M7  | M15 | M15 | M23 | M23 | M31 | M31 | M39 | M39 |
| B | CP | CP | M8  | M8  | M16 | M16 | M24 | M24 | M32 | M32 | M40 | M40 |
| C | M1 | M1 | M9  | M9  | M17 | M17 | M25 | M25 | M33 | M33 | M41 | M41 |
| D | M2 | M2 | M10 | M10 | M18 | M18 | M26 | M26 | M34 | M34 | CN  | CN  |
| E | M3 | M3 | M11 | M11 | M19 | M19 | M27 | M27 | M35 | M35 | CN  | CN  |
| F | M4 | M4 | M12 | M12 | M20 | M20 | M28 | M28 | M36 | M36 | B   | B   |
| G | M5 | M5 | M13 | M13 | M21 | M21 | M29 | M29 | M37 | M37 | B   | B   |
| H | M6 | M6 | M14 | M14 | M22 | M22 | M30 | M30 | M38 | M38 | P   | P   |

Donde:

- **CP:** Controles positivos (*pool* de sueros hiperreactivos).
- **M1-M41:** Muestras analizadas por placa.
- **CN:** Controles negativos (*pool* de sueros no reactivos).
- **B:** Pocillos blanco, tapizados con antígeno pero sin la adición de muestra problema eluída (en su lugar sólo se agregó la solución de elución: PBS-Blotto-Tween® 20). Estos pocillos fueron utilizados para evaluar el ruido de fondo, traducido como densidad óptica, atribuible enteramente a los reactivos utilizados en el ensayo y a la microplaca.
- **P:** Pocillos control de placa, no fueron tapizados con ningún antígeno ni se les adicionó muestra problema eluída (en su lugar sólo se agregó la solución de elución: PBS-Blotto-Tween® 20). Estos pocillos fueron utilizados para evaluar la calidad microplacas utilizadas ante cualquier contaminación de las mismas.

**ANEXO 3:** Categorización de los niveles de concordancia en base al Índice Kappa de Cohen según Landis y Koch (1977).

| Valor de Kappa | Grado de concordancia |
|----------------|-----------------------|
| <0.00          | Pobre.                |
| 0.00 – 0.20    | Leve.                 |
| 0.21 – 0.40    | Ligero.               |
| 0.41 – 0.60    | Moderado.             |
| 0.61 – 0.80    | Sustancial.           |
| 0.81 – 1.00    | Casi perfecto.        |

**ANEXO 4:** Tabla descriptiva de los 823 habitantes de cuatro comunidades del Distrito de Mazán, Departamento de Loreto.

|                  | COMUNIDADES                  |                          |                                  |                             |
|------------------|------------------------------|--------------------------|----------------------------------|-----------------------------|
|                  | Gamitanacocha<br>n = 94, (%) | Libertad<br>n = 298, (%) | Primero de Enero<br>n = 100, (%) | Urco Mirañó<br>n = 331, (%) |
| <b>Género</b>    |                              |                          |                                  |                             |
| - Masculino      | 45 (47.87)                   | 159 (53.36)              | 55 (55)                          | 174 (52.57)                 |
| - Femenino       | 49 (52.13)                   | 139 (46.64)              | 45 (45)                          | 157 (47.43)                 |
| <b>Edades</b>    |                              |                          |                                  |                             |
| - < 15 años.     | 41 (43.62)                   | 132 (44.30)              | 49 (49)                          | 178 (53.78)                 |
| - 15 – 39.9 años | 32 (34.04)                   | 98 (32.88)               | 32 (32)                          | 81 (24.47)                  |
| - < 40 años.     | 21 (22.34)                   | 68 (22.82)               | 19 (19)                          | 72 (21.75)                  |

**ANEXO 5:** Detalle de las estimaciones de seropositividad/seronegatividad encontradas usando la quimera, PvAMA-1 y PvMSP-1<sub>19</sub>.

| <b>Antígeno</b>       | <b><math>\bar{x}</math> DSN<br/>(%PP)</b> | <b>DE<br/>(%PP)</b> | <b>Punto de corte*<br/>(%PP)</b> | <b>Prevalencia<br/>(%)</b> | <b>95% CI<br/>(%)</b> |
|-----------------------|---|---------------------|----------------------------------|----------------------------|-----------------------|
| PvMSP-1 <sub>19</sub> | 2.98                                      | 1.72                | 8.14                             | 27.2                       | 24.3-30.4             |
| PvAMA-1               | 4.73                                      | 3.15                | 14.18                            | 33.7                       | 30.5-37.0             |
| Quimera               | 5.47                                      | 4.17                | 17.98                            | 33.9                       | 30.7-37.2             |

(DSN= distribución seronegativa calculada con modelos mixtos, PP = porcentaje de positividad, DE = desviación estándar, \* = 3 DE sobre la DSN).

**ANEXO 6:** Concordancia entre las estimaciones de PvAMA-1, PvMSP-1<sub>19</sub> y la quimera.

|  | <b>Seropositividad para:</b> |           |                             |           |
|--|------------------------------|-----------|-----------------------------|-----------|
|  | <b>PvAMA-1</b>               |           | <b>PvMSP-1<sub>19</sub></b> |           |
| <b>Seropositividad para la quimera</b> | <b>SI</b>                    | <b>NO</b> | <b>SI</b>                   | <b>NO</b> |
| <b>SI</b>                              | 303                          | 23        | 287                         | 39        |
| <b>NO</b>                              | 22                           | 475       | 4                           | 493       |
| Valor de Kappa (K)                     | 0.842                        |           | 0.724                       |           |
| 95% CI                                 | 0.803 – 0.882                |           | 0.673 – 0.775               |           |
| Concordancia general                   | 92.95%                       |           | 88.21%                      |           |
| Concordancia positiva                  | 89.57%                       |           | 73.02%                      |           |
| Concordancia negativa                  | 94.68%                       |           | 95.96%                      |           |

**ANEXO 7:** Valores en porcentaje de positividad de las 49 muestras declaradas como seropositiva contra cualquiera de los antígenos independientes (PvMSP-1<sub>19</sub> y/o PvAMA-1) pero seronegativas por la quimera usando puntos de corte a 3 desviaciones estándar. (La línea horizontal roja representa el punto de corte para la quimera establecido a 17.98% de reactividad).

